

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina



"Caracterización de subpoblaciones de monocitos proinflamatorios y proangiogénicos en la sangre periférica de pacientes con hepatitis crónica C: implicación en el establecimiento y progresión de la enfermedad"

Memoria que presenta Yolanda Rodríguez Muñoz para optar al

Grado de Doctor

Directores:

D. Ricardo Moreno Otero

Dña. Paloma Sanz Cameno

Madrid, 2012

A mis padres Toñi y Manuel, a mis hermanos Ana y Manolo, a mi yaya Inés.

A Rober.

AGRADECIMIENTOS

Y por fin parece que llega ese momento que para los doctorandos se hace tan lejano, casi inalcanzable, el remate final del trabajo de muchos años llevado a cabo con gran esfuerzo y dedicación. Ya con la tesis escrita y los nervios a flor de piel, llega uno de los momentos más gratificantes, echar la mirada atrás para recordar a todas las personas que han hecho posible esta tesis.

A mi director Ricardo le tengo que agradecer la oportunidad que me ofreció al poder trabajar en la Unidad de Hígado. Gracias por permitirme aprender, por acogerme con tanto cariño y por dejarme trabajar con un grupo de gente maravillosa. Gracias por hacer posible esta Tesis.

A Paloma, mi directora, consejera...muchas gracias por guiarme y ayudarme. Por iniciarme en este mundo complejo de la Investigación, por enseñarme con esa alegría y por todo el esfuerzo que has dedicado a este trabajo.

A Samu, mi compañero de peripecias, gracias por tu incansable apoyo, por tu ayuda y entusiasmo. Por las risas, disparates y los buenos momentos que han hecho el trabajo mucho más llevadero.

A Rosario por su apoyo y paciencia. Gracias por escucharme cuando lo he necesitado y por compartir las alegrías y tristezas. A Ángel y a M^a Jesús, por estar siempre dispuestos a ayudar y por los momentos tan divertidos que hemos pasado en nuestras reuniones de grupo.

A toda la gente de la 9^a a Paqui, Pedro, Patricia, Mati, Abelardo, Iñahui, Elena, Manuel....y a todos los que se han marchado Martita y Laura, las chicas de Anatomía patológica Irene y Belén, Ricardito, M^a Luisa, Marta...muchas gracias por vuestra

amabilidad y ayuda porque todos habéis puesto vuestro granito de arena en este trabajo. Tampoco puedo olvidar a las chicas de Inmuno, a Hortensia y Mónica, gracias por vuestra ayuda en los experimentos de citometría y esos arrays interminables, sin vosotras hubiera sido todo un poco más complicado.

A la gente del Servicio de Digestivo, a Marisa, María, M^a Jesús y a los chicos de “Gisbert”. A la gente del Servicio de Farmacología a Dolores, Manu, Ana José, Tere y Elba, gracias por vuestra positividad y vuestros ánimos.

A mi otra familia, a Chon, Jose, Silvia, Jose Luis, Nico y Carlota, por vuestra generosidad, por escucharme y apoyarme en todo momento, y por hacerme sentir una más.

A las personas que más quiero en este mundo. A mis padres, porque les debo todo y sin ellos no hubiera llegado a donde estoy. A mi padre Manolo por haberme inculcado ese interés por la biología, por sus sabios consejos y por su paciencia infinita. A mi madre Toñi por enseñarme a ser lo que soy, por ayudarme en todo lo que he hecho y por estar siempre ahí. A mis hermanos Manolo y Ana porque siempre puedo contar con ellos, gracias por vuestra comprensión y por compartir conmigo las alegrías y las penas. A mi Yaya Inés, por su cariño y alegría y porque es un ejemplo de vida para mí. A todos porque sois una familia maravillosa y porque sigamos siempre cerca.

A Rober, por haber intentado entender este mundo tan ajeno para él, por su paciencia y comprensión, por ser mi gran apoyo y darme fuerzas para seguir adelante. Por fin vamos a ver un poco de luz.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	5
1. INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C.....	7
1.1 GENOMA DEL VHC.....	7
1.1.1 Influencia patogénica de las proteínas del VHC.....	8
1.2 HISTORIA NATURAL DE LA HEPATITIS C.....	9
1.3 TRATAMIENTO DE LA HCC.....	10
1.3.1 Fármacos antivirales.....	12
1.3.2 Terapia combinada Peg-IFN más RIB.....	13
1.3.3 Nuevos tratamientos.....	14
2. PATOGENIA DE LA HCC.....	15
2.1 LA INFLAMACIÓN EN LA HCC.....	15
2.1.1 Inmunidad innata.....	16
a) Interferón.....	17
b) Células <i>Natural Killer</i>	17
c) Monocitos, nexo entre la inmunidad innata y adaptativa.....	18
d) Células dendríticas.....	19

2.1.2 Inmunidad adaptativa.....	20
a) Linfocitos T CD8 o citotóxicos.....	20
b) Linfocitos T CD4 o colaboradores “ <i>helper</i> ”	20
2.2 ALTERACIONES INTRAHEPÁTICAS ASOCIADAS A LA HCC: ANGIOGÉNESIS Y FIBROGÉNESIS.....	22
2.2.1 Fibrosis hepática.....	23
2.2.2 La angiogénesis en el hígado.....	25
a) Generación de nuevos vasos “ <i>Sprouting and budding</i> ”	25
b) Degradación de Matriz Extracelular y migración de CEs.....	26
c) Proliferación de CEs, organización tridimensional y ramificación de nuevos vasos.....	26
d) Maduración, estabilización y mantenimiento de los neovasos.....	27
2.2.3 Sistema Angiopoyetinas/Tie2.....	29
3. PAPEL PATOGENICO DE LOS MONOCITOS EN LA PROGRESIÓN DE LA HCC.....	30
3.1 MONOCITOS Y SUS SUBTIPOS.....	30
3.2 MONOCITOS, INFLAMACIÓN Y FIBROSIS.....	33
3.3 IMPLICACIÓN DE LOS MONOCITOS EN LA CARCINOGENESIS.....	34
3.4 INFLUENCIA DEL VHC EN LA FUNCIONALIDAD DE LOS MONOCITOS.....	35

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	37
MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
RESULTADOS.....	56
1. CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES MONOCÍTICAS EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON HCC.....	57
1.1 Análisis de variables clínicas.....	57
1.2 Heterogeneidad fenotípica de los monocitos en sangre periférica.....	58
1.3 Identificación de subpoblaciones de monocitos periféricos.....	61
1.4. Caracterización multiparamétrica de las diferentes subpoblaciones de monocitos periféricos.....	64
1.5. Polarización monocítica y variables clínicas.....	66
2. SECRECCIÓN DE FACTORES ANGIOGÉNICOS Y DE REMODELADO TISULAR POR LOS MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON HCC.....	68
3. EXPRESIÓN CELULAR DE ANGIOPOYETINAS/TIE2 EN LOS MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA.....	70
4. ENSAYOS DE INVASIÓN.....	73
5. IDENTIFICACIÓN DE TEMs EN LOS INFILTRADOS HEPÁTICOS DE PACIENTES CON HCC.....	75
6. EVALUACIÓN DE MONOCITOS Y CÉLULAS DERIVADAS DE MONOCITOS (CD-Mo) EN PACIENTES CON HCC.....	78

6.1 Diferencias fenotípicas en la diferenciación y maduración de CD-Mo en pacientes con HCC y controles.....	78
6.1.1 Transición monocito – MDMs.....	78
6.1.2 Diferenciación y maduración de CDDMs.....	79
6.2 Análisis fenotípico de CD-Mo de sangre periférica.....	82
6.3 Niveles de expresión de angiopoyetinas durante la diferenciación y maduración.....	84
6.3.1 Expresión de angiopoyetina 1.....	84
6.3.2 Expresión de angiopoyetina 2.....	86
6.3.3 Relación angiopoyetina 2/ angiopoyetina 1.....	88
DISCUSIÓN.....	90
CONCLUSIONES.....	107
BIBLIOGRAFÍA.....	109
PUBLICACIÓN.....	119

ABREVIATURAS

VHC	Virus de la Hepatitis C
HCC	Hepatitis Crónica C
Peg-IFN	Interferón pegilado
RIB	Ribavirina
CDs	Células dendríticas
MMPs	Metaloproteasas de matriz
CEH	Células estrelladas hepáticas
TGF	Factor de crecimiento transformante
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
RV	Respuesta virológica
ARN	Acido desoxirribonucleico
RVS	Respuesta virológica sostenida
IMPDH	Inosina monofosfato dehidrogenasa
IL	Interleucina
NK	Células “natural killer”
TLR	Toll like receptor
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene 1
MDA5	Melanoma differentiation-associated gene 5
CPA	Células presentadora de antígeno
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad clase I
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
CD-Mo	Células derivadas de monocitos
TNF-alfa	Factor de necrosis tumoral alfa
MIP	Proteína inflamatoria de los macrófagos

CEs	Células endoteliales
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
NO	Óxido nítrico
ME	Matriz extracelular
HIF	Factores de transcripción dependientes de hipoxia
HPHs	Hidroxiprolina hidroxilasa
FIH1	Asparaginil hidroxilasa,
HREs	Secuencias de respuesta a hipoxia
LB	Lámina basal
TIMPs	Inhibidores específicos de metaloproteasas de matriz extracelular
B-FGF	Factor de crecimiento básico de fibroblastos
Ang1	Angiopoyetina 1
Ang2	Angiopoyetina 2
LPS	Lipopolisacarido
TEMs	"Tie-2 expressing monocytes"
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
TAMs	Macrófagos asociados a tumores
IRAK1	Receptor asociado cinasa de la IL-1
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VHB	Virus de la Hepatitis B
AMA	Anticuerpos antimitocondriales
SMA	Anticuerpos antimúsculo liso
ANA	Anticuerpos antinucleares

LKM1	Anticuerpos antimicrosoma de hígado y riñón de rata
LC1	Anticuerpos anticitosol hepático tipo 1
L	Litro
IC	Intervalo de confianza
GOT	Transaminasa glutámico oxalacética;
GPT	Transaminasa glutámico-pirúvica;
G-GT	Gamma-glutamyl transpeptidasa
ml	Mililitro
PBS	Buffer fosfato salino
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
FBS	Suero fetal bovino
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
MDM	Macrófagos derivados de monocitos
MDDC	Células dendríticas derivadas de monocitos
APC	Aloficocianina
FITC	Fluoresceína
PE	Ficoeritrina
FSC	“forward scatter”, tamaño
SSC	“side scatter”, complejidad
TNB	Buffer de bloqueo Tris-NaCl
IMF	Intensidad media de fluorescencia
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
HB-EG	Factor de unión a heparina de crecimiento EGF-like
PLGF	Factor de crecimiento placentario
MMP-1	Metaloproteasa de matriz 1

MMP-2	Metaloproteasa de matriz 2
MMP-3	Metaloproteasa de matriz 3
MMP-8	Metaloproteasa de matriz 8
MMP-9	Metaloproteasa de matriz 9
MMP-10	Metaloproteasa de matriz 10
MMP-13	Metaloproteasa de matriz 13
TIMP-1	Inhibidor de metaloproteasas de matriz extracelular 1
TIMP-2	Inhibidor de metaloproteasas de matriz extracelular 2
TIMP-4	Inhibidor de metaloproteasas de matriz extracelular 4
nm	Nanómetro
Ang1r	Angiopoyetina 1 recombinante
Ang2r	Angiopoyetina 2 recombinante

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La infección causada por el virus de la hepatitis C (VHC) afecta a 120-170 millones de personas en todo el mundo [1, 2] y su principal ruta de transmisión es por vía parenteral. En la actualidad, la infección por VHC es la primera causa de trasplante hepático en Europa y Estados Unidos, lo que constituye un grave problema socio-sanitario [3]. Tras la infección aguda, más de un 80% de los afectados desarrollaran hepatitis crónica C (HCC) como consecuencia de la ineficacia de la respuesta inmune para erradicar el virus y la persistencia de los fenómenos inflamatorios [4].

La incapacidad del sistema inmune para suprimir la infección por el VHC implica un daño constante del tejido hepático que demanda la afluencia continua de células inmunes para eliminar el virus y mediar la reparación tisular. Los monocitos ejercen un papel esencial tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, y constituyen uno de los mediadores inmunológicos más importantes del remodelado vascular [5-8]. Su diversidad fenotípica y funcional les permite desempeñar un amplio espectro de acciones en las distintas etapas de la respuesta inmune, en la formación y maduración de la vasculatura [9-12] y, eventualmente, en los fenómenos de inflamación y angiogénesis asociados al desarrollo y progresión de la HCC.

El curso evolutivo de la HCC es muy lento y las complicaciones de la enfermedad no se manifiestan hasta 20 o 30 años después de la infección; sin embargo, el deterioro progresivo de la función hepática conduce en un alto porcentaje de los casos al desarrollo de fibrosis, cirrosis y carcinoma hepatocelular [13]. Por ahora no existe ninguna vacuna efectiva [14] y el tratamiento estándar, consistente en Interferon alfa pegilado (peg-IFN) más ribavirina (RIB), sólo alcanza el 50% de efectividad [15], presentando efectos secundarios graves que dificultan la continuidad de la terapia [16].

Recientemente se ha aprobado la utilización de dos nuevos inhibidores de proteasa vírica, cuyo efecto antiviral directo consigue elevar la respuesta terapéutica hasta el 75-85% [17, 18].

1. INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

1.1 GENOMA DEL VHC

El VHC, perteneciente a la familia *Flaviviridae*, fue identificado por Choo y colaboradores en 1989 [19]. Es un virus con envoltura lipídica, cuyo genoma, constituido por una cadena de ARN de polaridad positiva de 9.6 kb, codifica para una única poliproteína de 3000 aminoácidos. Durante el procesamiento, esta proteína se escinde por acción de las proteasas virales y celulares dando lugar a diez proteínas maduras. Entre ellas se encuentra la proteína p7, las proteínas estructurales que incluyen la proteína del Core y las proteínas de la envoltura (E1 y E2), y las proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) [20].

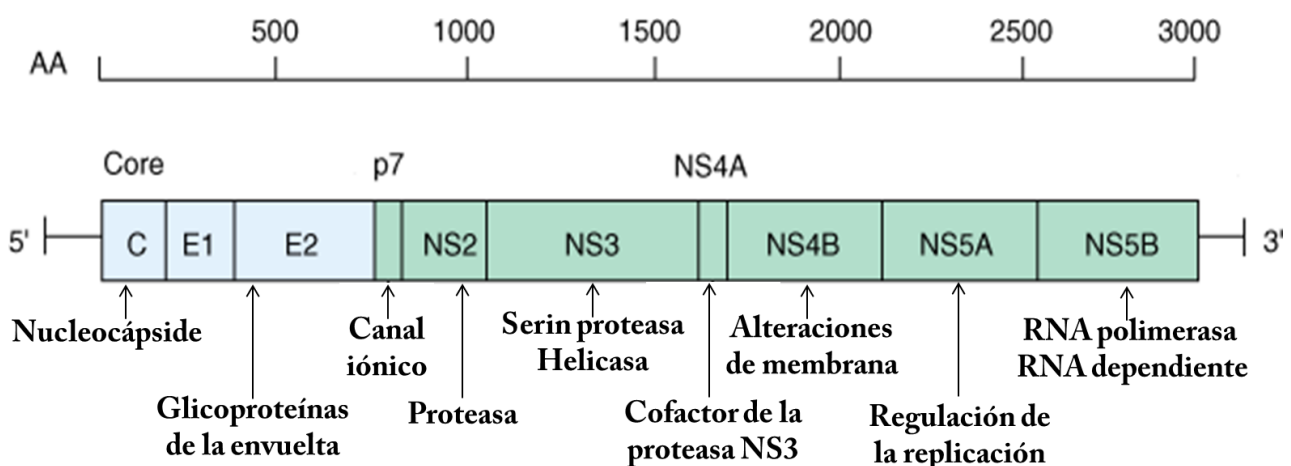


Figura 1. Genoma del virus de la hepatitis C.

La elevada heterogeneidad del genoma del VHC ha permitido clasificar las diferentes variantes víricas en 6 genotipos (1-6) y varios subtipos (a, b, c), que se caracterizan en función de su homología y distribución geográfica [21]. Además, debido a la alta tasa de replicación del virus y el elevado número de errores que comete la polimerasa viral, el individuo infectado puede presentar distintas variantes del VHC denominadas cuasiespecies [22].

El órgano diana del VHC es el hígado y entre las células que lo forman, este virus infecta a los hepatocitos, donde es capaz de completar su ciclo de replicación. Sin embargo varios estudios han demostrado la capacidad del VHC de infectar y replicarse en otras células y tejidos humanos, incluidos los linfocitos T y B, células dendríticas (CDs), macrófagos y monocitos [23].

1.1.1 Influencia patogénica de las proteínas del VHC

Diversos estudios han descrito la capacidad proangiogénica y profibrogénica específica de diversas proteínas del VHC. La proteína Core es capaz de inducir la metaloproteasa de matriz 9 (MMP-9), involucrada en los fenómenos de remodelado y reparación tisular, en líneas celulares derivadas de hepatocitos humanos. De forma semejante, otros autores han observado la influencia de Core y de la región no estructural del VHC (NS3-NS5) en la activación de las células estrelladas hepáticas (CEH) y por tanto en la fibrosis asociada a la HCC [24]. Asimismo, se ha descrito la influencia de Core en la inducción del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) al modular diversos factores de transcripción como AP1, E2F1 o CREB [25]. Otros autores han determinado que la interacción entre la proteína estructural E2 del VHC y la tetraspanina CD81 en las células estrelladas hepáticas (pericitos hepáticos especiales) promueve la expresión de la

metaloproteasa MMP-2, concluyendo que la destrucción de la matriz extracelular hepática mediada por dicha interacción puede favorecer el desarrollo del infiltrado inflamatorio y la progresión de la enfermedad [26].

1.2 HISTORIA NATURAL DE LA HEPATITIS C

La infección primaria por el VHC provoca una hepatitis aguda que en la mayoría de las ocasiones cursa de manera subclínica. Sólo entre el 20-30% de los casos presentan sintomatología, lo que explica que la hepatitis C sea rara vez diagnosticada en la fase aguda. En el 15-25% de los afectados la infección es autolimitada y remite de forma espontánea; sin embargo, el 75-85% de los pacientes desarrollan una infección persistente (acompañada de niveles detectables de ARN del VHC en sangre y niveles anormales de transaminasas) que finalmente desemboca en la cronificación de la enfermedad hepática.

Los mayores índices de morbilidad y mortalidad de la HCC se asocian al establecimiento de la fibrosis hepática, y al consecuente desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular. En alrededor de un 15% de los casos la HCC sigue un curso progresivo hasta la cirrosis [27], y una vez establecida, la incidencia anual de carcinoma hepatocelular es de aproximadamente el 3% [28] y siendo excepcional su desarrollo en ausencia de cirrosis [29, 30]. En general, el curso evolutivo de la enfermedad es muy lento, de forma que la aparición de cirrosis no surge hasta 10-20 años después de adquirir la infección. La cirrosis es la consecuencia de un daño progresivo en el hígado, que se caracteriza por la acumulación de fibrosis en el tejido hepático, y la aparición de fenómenos inflamatorios y angiogénicos patológicos persistentes. Estos procesos causan intensos cambios en la estructura normal del hígado, ocasionando serias complicaciones

en la circulación de la sangre a través de dicho órgano (síndrome de hipertensión portal) y en sus funciones.

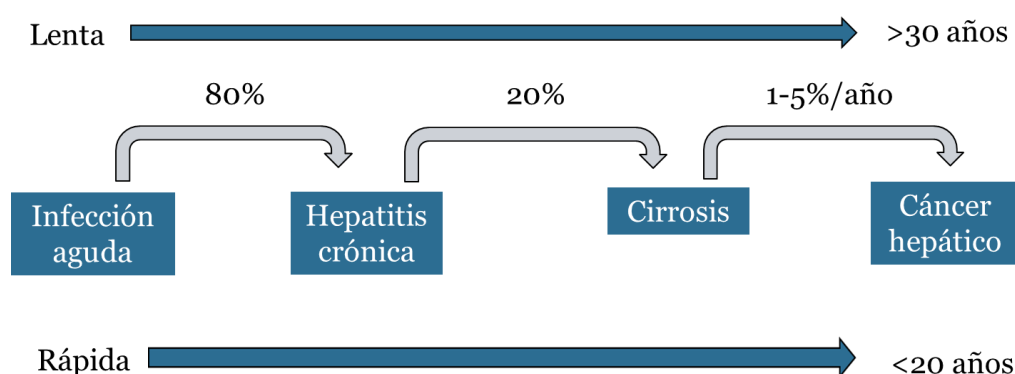


Figura 2. Esquema de la historia natural de la hepatitis crónica C.

Se han descrito diversos factores que pueden influir en la evolución de la hepatitis C a formas más avanzadas de la enfermedad como fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma; entre los factores relativos al huésped se encuentran el sexo masculino, la edad avanzada en el momento de la infección [31-33], el estado inmunológico [22] y la coexistencia de otras enfermedades como la diabetes mellitus tipo II y la esteatopatitis [34]. La presencia de coinfecciones virales (virus de la Hepatitis B y virus de la inmunodeficiencia humana) [35-37] el consumo excesivo de alcohol [38, 39] y el tabaquismo, también influyen negativamente en la evolución de la HCC, asociándose a una mayor actividad y gravedad de las lesiones hepáticas y a un mayor riesgo de desarrollo de hepatocarcinoma [40].

1.3 TRATAMIENTO DE LA HCC

Desde el punto de vista clínico, los objetivos de tratamiento de los pacientes con HCC persiguen disminuir la morbilidad, la mortalidad, la necesidad de trasplante hepático y el desarrollo de hepatocarcinoma [27, 41]. A la hora de hablar del tratamiento debemos

tener en cuenta la respuesta bioquímica, que se define como la normalización de las transaminasas séricas al final del tratamiento y tras seis meses de seguimiento. La elevación de las transaminasas refleja el grado de necrosis hepatocelular y, por lo tanto, su normalización es un buen marcador de la respuesta a la terapia, sea ésta completa o parcial [27]. No obstante, la respuesta virológica (RV) corresponde a la disminución significativa de la carga viral o desaparición del ARN del VHC del suero. Pero como el objetivo final del tratamiento es la erradicación del virus en forma definitiva, se requiere una rápida caída de la carga viral e idealmente una desaparición precoz del VHC. Ésto tiene una gran importancia pronóstica para predecir el resultado final y para continuar el tratamiento [27]. Se pueden definir distintos tipos de respuesta:

- RV precoz: es la negativización o disminución significativa de la carga viral a las 4 semanas de tratamiento.
- RV extendida: es la persistencia de la negativización de la viremia en la semana 12 de tratamiento.
- RV al fin del tratamiento: es la ausencia de viremia al finalizar la pauta terapéutica.
- RV sostenida (RVS): es la ausencia de viremia 6 meses después del término del tratamiento.
- RV parcial: es la disminución de la carga viral durante el tratamiento, sin lograr su eliminación.
- No respuesta: es la ausencia de cambios significativos de la carga viral durante el tratamiento.
- Recidiva: es la reaparición de la viremia 6 meses después del término del tratamiento, habiendo sido negativa al final de éste.

1.3.1 Fármacos antivirales

- INTERFERÓN: Los interferones son proteínas o glicoproteínas, que producen distintas células en respuesta a diferentes estímulos, en especial a infecciones virales. Los interferones naturales tienen un importante papel en la respuesta a las infecciones virales como mediadores de la respuesta viral inespecífica y como estimuladores de la respuesta inmune. También poseen propiedades antiproliferativas y antifibrogénicas. En el tratamiento de la infección por VHC se ha utilizado el IFN-alfa, tanto en su forma recombinante, como en la forma pegilada, desarrollada en los últimos años con el fin de mejorar la cinética del fármaco.

Los dos interferones disponibles en este momento son el alfa 2a (40 KD) y alfa 2b (12KD), con diferencias en su estructura, volumen de distribución y vía de eliminación, pero fundamentalmente en su dosificación. Múltiples estudios han puesto de manifiesto la superioridad del tratamiento con Peg-IFN α -2a o α -2b sobre el interferón estándar no pegilado [31, 32, 42]. Además, un metaanálisis de 12 estudios comparativos de Peg-IFN α -2a y α -2b [43] mostró una mayor tasa RVS con Peg-IFN α -2a respecto a α -2b. A pesar de ello, las guías actuales [44-46] recomiendan indistintamente el uso de cualquiera de los dos tipos de Peg-IFN en combinación con RIB como tratamiento de elección.

- RIBAVIRINA: Es un análogo de nucleósido que usado en monoterapia tiene poco efecto antiviral sobre el VHC, pero que en combinación con interferón ha demostrado aumentar su potencia. Su asociación al Peg-IFN aumenta las tasas de RVS, disminuyendo principalmente el número de recidivas. Su mecanismo de acción no es bien conocido, proponiéndose varios: inhibición de la inosina monofosfato

dehidrogenasa (IMPDH), inhibición de la ARN polimerasa, inmunomodulación por aumento de la inmunidad celular y mutagénesis viral.

-INHIBIDORES DE LA SERÍN-PROTEASA NS3/4A: La proteína NS3 forma con el cofactor NS4A una serín-proteasa responsable de la escisión de la poliproteína del VHC en 4 proteínas funcionales no estructurales. La importancia en el ciclo replicativo del VHC de la serínproteasa NS3/4A radica en que la replicación viral no puede iniciarse hasta que todas las proteínas han sido escindidas a partir de la poliproteína inicial. Hasta el momento se han desarrollado dos inhibidores covalentes frente a la serín-proteasa NS3/4A del genotipo 1 del VHC derivados de las α -cetoamidas, el Telaprevir y el Boceprevir, que consiguen, en combinación con Peg-IFN y RIB unas tasas de RVS de hasta el 85% [15, 17, 18].

1.3.2 Terapia combinada Peg-IFN más RIB

Los esquemas de tratamiento recomendados actualmente son la combinación de Peg-IFN más RIB [2]. Está establecido que los pacientes con HCC con genotipo 1 deben tratarse durante 48 semanas y con dosis de RIB ajustadas al peso (1000-1200 mg/día, si el peso es menor o mayor que 75 Kg) y que los pacientes con genotipos 2 y 3 sólo se tratarán durante 24 semanas y con menores dosis de RIB (800 mg/día) [47].

Se ha comprobado que el genotipo viral es uno de los aspectos más importantes en el pronóstico de la respuesta tras el tratamiento antiviral combinado [48-50]. Así, los pacientes infectados por los genotipos 2 y 3 del VHC alcanzan una RVS en el 65% de los casos, mientras que los pacientes con VHC de genotipo 1 sólo presentan RVS en un 30% [51-53].

Por otro lado, la respuesta terapéutica diferencial descrita para distintos pacientes en función del genotipo viral puede estar condicionada por distintas variantes

alélicas que se encuentran en la dotación génica del paciente. Así, se ha relacionado la presencia del polimorfismo del alelo T del SNP rs12979860 de la interleucina-28 (IL-28) en pacientes infectados por el genotipo 1 del VHC con una menor tasa de RVS (26% en sujetos TT vs. 79% en CC). Por ello, la determinación del genotipo de la IL-28B es determinante a la hora de establecer la duración óptima de la terapia antiviral así como del pronóstico del curso de la enfermedad.

1.3.3 Nuevos tratamientos

Existen en la actualidad numerosos fármacos, que se encuentran en distintas fases de la investigación científica y farmacológica (fases preclínicas y fases 1, 2 y 3) y que se pueden clasificar en varios grupos: inhibidores enzimáticos (proteasas, polimerasas y helicasas), inmunomoduladores como el interferón (albuferón de administración mensual o inductores orales), inhibidores de la IMPDH, análogos de RIB (levovirina, viramidina) y antivirales de amplio espectro (amantadina, rimantadina). Estudios recientes han demostrado tasas de RVS entre un 61-68% y 67-75% después del tratamientos combinado de Peg-IFN con inhibidores de la proteasa viral como telaprevir [17] y boceprevir [18], respectivamente, en los pacientes infectados por VHC de genotipo 1, tanto “naïve” como tratados previamente, pero no respondedores.

Por otra parte, aún se está trabajando en la producción de una inmunización pasiva mediante la administración de anticuerpos preformados sobretodo inmunoglobulinas (especialmente para evitar la reinfección de los trasplantes de hígado) y en el desarrollo de vacunas efectivas [54].

2. PATOGENIA DE LA HEPATITIS CRÓNICA C

2.1 LA INFLAMACIÓN EN LA HCC

Existe una relación directa entre el sistema inmunológico y la patogenia de la HCC. La relación virus-hospedador es un proceso dinámico en el que el VHC trata de disminuir su reconocimiento y escapar a la vigilancia inmunológica, mientras que el hospedador trata de prevenir y erradicar la infección con el menor daño colateral [3].

Tras su entrada en la célula diana, el VHC se replica para liberar nuevos viriones. A su vez se activan mecanismos tempranos de la inmunidad innata para evitar su diseminación. Sin embargo, a pesar de ser reconocido por el sistema inmunitario innato, el VHC establece una infección persistente y crónica en la mayoría de los casos.

La interacción entre los componentes del VHC y el sistema inmune determina que la balanza se incline a favor del VHC, estableciendo una infección crónica, o a favor del hospedador, condicionando el aclaramiento del virus. Existen evidencias de que tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa tienen un papel determinante en el resultado de la infección. Los pacientes que resuelven la enfermedad aguda presentan respuestas proinflamatorias multiepitópicas tipo Th1 sostenidas basadas en linfocitos T CD4 y CD8, mientras que los pacientes con enfermedad crónica se caracterizan por presentar respuestas bajas o nulas y frente a pocos epítomos [3, 55-61]. No obstante, se ha observado que en los pacientes que desarrollan la infección crónica, la respuesta de las células T es brevemente vigorosa y no ausente en el inicio de la infección, lo que indica que el mantenimiento de la respuesta de los T CD4 es esencial para lograr el aclaramiento del virus. Además, la disfunción en el reconocimiento de los epítomos del VHC por parte de los T CD8, disminuye la magnitud de la respuesta específica en casi tres cuartas partes. Estos resultados indican que la respuesta adaptativa no es suficiente

por sí sola para superar la infección, lo que sugiere que el fracaso en la eliminación del VHC podría deberse a defectos en la capacidad de reconocimiento del sistema inmune innato, y en su incapacidad para activar una respuesta adecuada y de larga duración.

Se han descrito diferentes factores que pueden favorecer el proceso de cronificación, entre ellos destacan el desarrollo de estrategias de escape inmunitario por el VHC, el ambiente tolerogénico del hígado, y la persistente alta carga viral [22].

2.1.1 Inmunidad innata

La inmunidad innata es la primera línea de defensa en la respuesta del huésped a la infección viral. Las principales células que participan en la respuesta inmune innata son las de origen mieloide e incluyen monocitos, macrófagos, células dendríticas (CDs) y células “*natural killer*” (NK); todas ellas presentes en el hígado y equipadas con receptores para la detección de patógenos [62].

Los monocitos, macrófagos y células dendríticas actúan como efectores y reguladores de la inflamación gracias a su capacidad para capturar antígenos, producir radicales libres de oxígeno y citocinas pro- y anti- inflamatorias. Las células dendríticas poseen una sofisticada maquinaria de presentación antigénica y activación de células T mediada por la expresión de moléculas co-estimuladoras y la producción de citocinas, mientras que las células NK interaccionan con las células infectadas por el virus, los linfocitos T y las células dendríticas.

El reconocimiento de patógenos víricos por la acción coordinada de las células del sistema inmune innato da lugar a la activación de la inmunidad adaptativa específica enfocada a la eliminación del virus. De entre los diferentes receptores de reconocimiento de patógenos, los “Toll-like receptors” (TLR) y los receptores de ARN helicasa juegan un papel importante en la detección del ARN viral y en la producción

inicial de IFN tipo I en hepatocitos (IFN alfa y beta) [63, 64]. El ARN de doble cadena es reconocido por TLR3 (toll like receptor 3) expresado en endosomas y por RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1) y MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) localizados en citosol, mientras que el ARN de una sola cadena es detectado por TLR7 y TLR8.

a) Interferón: la infección vírica de las células promueve la producción de interferones (IFNs) con acción antiviral que desempeñan un papel crucial en el control de la replicación del VHC. Los IFNs alfa y beta son secretados por las células con el fin de proteger de la infección vírica, activando a las células NK, capaces de destruir a las infectadas por el VHC de forma selectiva [65] y de inducir la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I. De esta manera, se estimula la presentación de moléculas antigénicas a linfocitos T CD8 citotóxicos que atacan la célula infectada.

El IFN tipo I regula la maquinaria de procesamiento antigénico a través de la inducción de inmunoproteasomas en el lugar de la infección [66] y activa la expresión de más de 300 genes estimulados por IFN que también tienen funciones antivirales. El IFN tipo III (lambda) o IL -28/29 presenta una actividad biológica similar al IFN tipo I pero a través de un receptor distinto. En estudios recientes se ha visto que este tipo de IFN es capaz de inhibir la replicación del VHC produciendo menos efectos adversos que el IFN I lo que sugiere que puede ser una estrategia útil en el tratamiento de la hepatitis C [67]. El IFN tipo II (gamma) es producido por linfocitos CD4+ Th1 y representa el paso de inmunidad innata a inmunidad adaptativa.

b) Células “Natural Killer”: las células NK actúan en etapas iniciales del proceso infeccioso reconociendo y destruyendo patógenos mediante citolisis. Interaccionan con la células infectadas por el virus, linfocitos T y células dendríticas [62, 68]. Se ha visto que en pacientes infectados por el VHC las células NK producen

citocinas que atenúan la respuesta inmune adaptativa “*in vitro*”, tales como el TGF- β e IL-10 [69] y tienen menor capacidad de lisar las células de hepatoma. También sobreexpresan receptores que inhiben la producción de IFN- γ , lo que resulta en un descenso de la actividad anti-VHC [70, 71].

c) Monocitos, nexo entre la inmunidad innata y adaptativa: entre las células del sistema inmune innato, los monocitos/macrófagos representan uno de los grupos más importantes y heterogéneos por sus características e implicación en diversos procesos de la respuesta a la infección. Los monocitos/macrófagos son células presentadoras de antígenos (CPA, al igual que células dendríticas) que activan la respuesta inmune adaptativa mediante la captación, el procesamiento y presentación de los antígenos extraños asociados al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC de clase II y I) estimulando, de esta forma, a los linfocitos. Son productores de proteínas con potente efecto local (enzima activadora de plasminógeno, fosfolipasa, prostaglandina, leucotrieno B₄, factor activador de plaquetas, ácido nítrico), de citocinas inflamatorias e inmunomoduladoras y de radicales libres con capacidad oxidativa [72].

Durante la inflamación, los monocitos migran desde la sangre hasta los tejidos linfoides y el hígado en respuesta a señales derivadas del tejido causadas por la infección o por daño tisular [73]. Una vez allí producen citocinas inflamatorias y fagocitan células apoptóticas y moléculas tóxicas. Por otro lado, los monocitos circulantes juegan un papel fundamental en la renovación de las poblaciones de macrófagos y CD₄ tisulares. Una vez se extravasan desde el torrente sanguíneo al tejido lesionado pueden diferenciarse tanto a macrófagos como a CD₄ inflamatorias [10, 74] en función de los distintos estímulos, pasando a denominarse células derivadas de monocitos (CD-Mo).

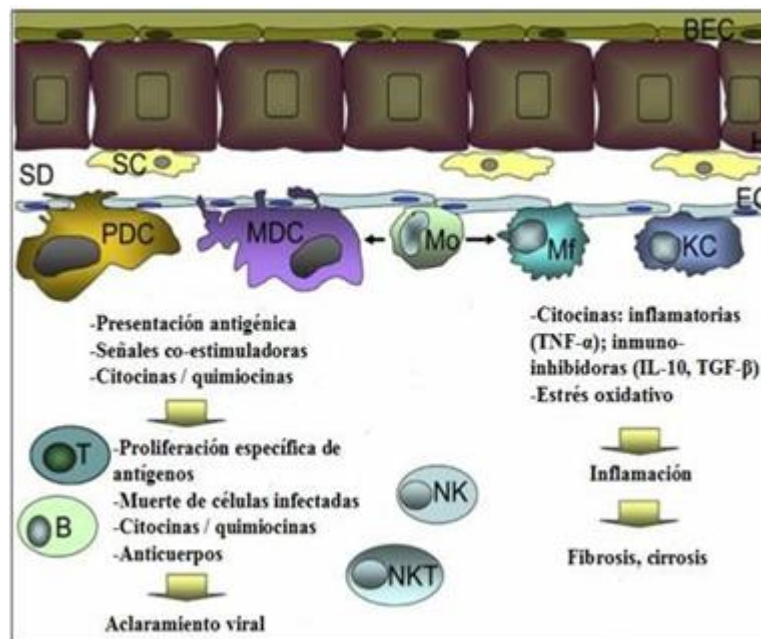


Figura 3: Representación esquemática de las células inmunes en el hígado. (H: hepatocitos; BEC: células endoteliales biliares; SC: células estrelladas; SD: espacio de Disse; PDC y MDC: células dendríticas de origen plasmocitoide y mielóide; Mo: monocitos; MF: macrófagos; KC: células de Kupffer; NK: células NK. (Modificado de Szabo G, Dolganiuc A. Hepatitis C and innate immunity: recent advances. *Clin Liver Dis.* 2008 Aug; 12(3):675-92).

d) Células dendríticas: las CDs tienen un papel crucial como moduladores de la respuesta inmunitaria antiviral por ser CPA «profesionales». Las CDs se encargan de la presentación de antígenos e inducen la activación de células T a través de la expresión de moléculas co-estimuladoras y la producción de citocinas. La función de las CDs es deficiente durante la infección crónica por el VHC [75]. Un estudio reciente realizado por Rodrigue Gervais y colaboradores encontró presencia de ARN genómico del VHC en monocitos de pacientes con HCC y, con niveles de expresión inferiores, en las células dendríticas circulantes [76]. En este estudio, la infección por el VHC de las CDs se asociaba con una expresión alterada de interleucina 12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) [76]. En pacientes infectados por el VHC, la proteína NS4 es

capaz de modificar el fenotipo de CD8 y reducir la función de estimulación de células T específicas del antígeno y por tanto, reducir también la producción de citocinas Th1 [77]. También, la unión de la proteína Core al receptor del complemento gC1qR en CD8 limita la inducción de la respuesta Th1 (disminución de IFN- γ e IL-2) y contribuye a la persistencia viral [78]. También se ha demostrado la capacidad de Core y NS3 de inhibir la diferenciación, pero no la maduración de las CD8 [79].

2.1.2 Inmunidad adaptativa

A pesar de la respuesta inmune innata y la producción de IFN, la resolución de la infección por VHC depende de la respuesta inmune adaptativa [22]. La respuesta inmunitaria adaptativa mediada por células es la encargada de reaccionar contra patógenos intracelulares, como es el caso del VHC. En esta respuesta intervienen principalmente:

a) Linfocitos T CD8 o citotóxicos: estas células responden a la infección por el VHC a través de dos mecanismos principales: el lisado de hepatocitos y otras células infectadas mediante el reconocimiento de péptidos antigénicos de origen viral restringidos por MHC de clase I y a través de la secreción de citocinas con acción antiviral como el IFN- γ , el TNF- α y IL-2, o bien quimiocinas como MIP-1- α (de macrophage inflammatory protein, proteína inflamatoria de los macrófagos) y MIP-1 β [80].

b) Linfocitos T CD4 o colaboradores “helper”: las células T CD4+ activadas secretan citocinas, que coordinan la respuesta inmunitaria global contra el virus. Dependiendo de las citocinas producidas, las células Th pueden promover el desarrollo de una respuesta celular con las células CD8+ como efectores principales (respuesta Th1), o una respuesta humoral mediada por anticuerpos producidos por los linfocitos B

(respuesta Th2). Además, las células T CD4⁺ activan las CPA, que son esenciales para la estimulación efectiva de la respuesta por células T CD8 [80].

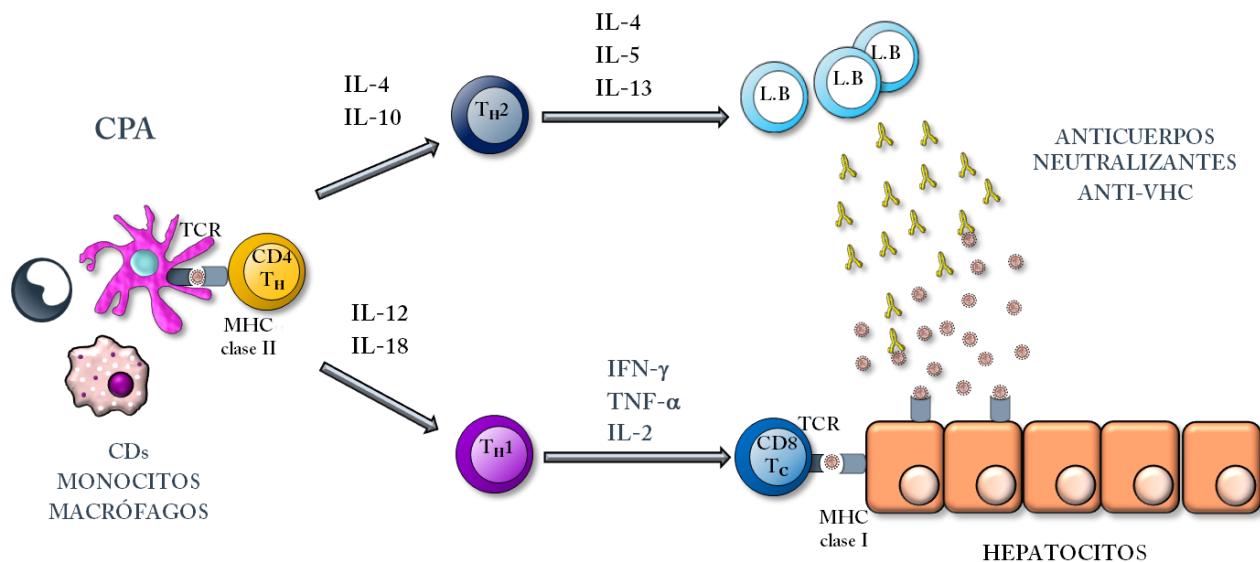


Figura 4. Respuesta inmune adaptativa frente a la infección por el VHC. (CPA: células presentadoras de antígeno; MHC: complejo principal de histocompatibilidad; TCR: receptor de células T; Th: linfocitos T helper; Tc: linfocitos T citotóxicos).

Al contrario de lo que ocurre en los pacientes que consiguen eliminar el virus durante la infección aguda, la evolución a la cronicidad se asocia a una disfunción temprana y persistente en la respuesta inmunitaria de células T. En los pacientes con HCC la respuesta de las células T CD4⁺ y CD8⁺ es débil y dirigida frente a pocos epítomos. Las células T CD8⁺ específicas contra el VHC no proliferan significativamente después de la estimulación “*in vitro*” con el antígeno, no producen IFN-γ en respuesta a péptidos del VHC y despliegan baja citotoxicidad específica contra el virus “*in vitro*”. Además, la respuesta de células T CD4⁺ apenas es detectable “*ex vivo*”, con una capacidad limitada de expansión y una producción defectuosa de citocinas Th1, como IL-2 y TNF-α. A pesar de lo débil y defectuosa que pueda ser la respuesta inmunitaria en la

erradicación de la infección crónica por el VHC, supone un factor crucial en la génesis del daño hepático y en el desarrollo de fibrosis y cirrosis. La respuesta inmunitaria celular contribuye al control del virus en primera instancia y a la inflamación hepática en la enfermedad crónica [81]. La muerte de células inflamatorias en el hígado, la lisis de los hepatocitos infectados y la secreción de citocinas inflamatorias de forma mantenida en el tiempo favorece la activación de las CEHs, que son la fuente principal de la matriz extracelular en la fibrosis hepática [82].

2.2 ALTERACIONES INTRAHEPÁTICAS ASOCIADAS A LA HCC: ANGIOGÉNESIS Y FIBROGÉNESIS

La HCC debe ser entendida como una enfermedad multifactorial en la que el daño hepatocelular y la inflamación persistente derivan en la mayoría de las ocasiones en el desarrollo de fibrosis hepática así como en su evolución ulterior hacia cirrosis. En el hígado, la persistencia de la infección por VHC se traduce en la aparición de infiltrados inflamatorios característicos en los que predominan los linfocitos T CD8, una intensa inflamación de los lóbulos hepáticos y la dilatación del espacio porta, fenómenos que agravan el daño hepatocelular y contribuyen a la progresión de la enfermedad [22]. La neovascularización y el establecimiento de una arquitectura vascular anormal a nivel hepático son fenómenos que también se encuentran estrechamente ligados a esta progresión, y están directamente relacionados con la patogénesis de la HCC.

El VHC es capaz de evadir la respuesta inmune a través de múltiples estrategias, lo que resulta en el establecimiento de la inflamación crónica. El incremento de la permeabilidad vascular y la secreción de citocinas proinflamatorias, favorecen el reclutamiento de monocitos, macrófagos, plaquetas y otros leucocitos capaces de sintetizar citocinas proangiogénicas y factores de crecimiento [83, 84]. Determinados

mediadores inflamatorios como TGF- β , IL-1, IL-6 IL-8 o IL-18 pueden estimular la angiogénesis de forma directa actuando sobre las células endoteliales (CEs), o bien de forma indirecta estimulando la expresión de otros factores con acción tanto pro-angiogénica como pro-fibrogénica como VEGF, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y óxido nítrico (NO) [85].

2.2.1 Fibrosis hepática

El proceso inflamatorio activa los procesos de reparación tisular con el fin de regenerar el tejido y retornar a las condiciones fisiológicas de reposo. La fibrosis hepática es un proceso dinámico de reparación tisular en respuesta a un daño hepático prolongado y es el resultado de un complejo sistema de interacciones entre las células residentes en el hígado, las células del infiltrado inflamatorio y determinadas citocinas liberadas de manera local.

En una primera etapa el tejido dañado demanda el reclutamiento de leucocitos con el fin de neutralizar el agente causal de la infección y eliminar el tejido necrótico. Posteriormente se origina la proliferación y migración de células endoteliales que promueven la neoangiogénesis y neovascularización de las zonas dañadas para permitir el acceso de nutrientes, células del sistema inmune y otros factores. Paralelamente se produce la activación de las CEHs que secretan proteínas de la matriz extracelular (ME) con el fin de reparar las zonas lesionadas. Si estos fenómenos se desarrollan correctamente se produce la regeneración del tejido funcional parenquimático. Sin embargo, cuando este daño hepatocelular persiste, la activación de los mecanismos de reparación tisular se perpetúan en el tiempo de manera descontrolada; el resultado es una inflamación crónica y una deposición permanente de proteínas de la ME que

terminan por alterar la composición fisiológica de la matriz extracelular. La persistencia de estos fenómenos provoca la alteración de la arquitectura hepática y la pérdida del tejido funcional, lo que finalmente puede desembocar en cirrosis hepática e incluso carcinoma hepatocelular [86].

En estadios avanzados de la enfermedad hepática (HCC), la formación de tabiques fibrosos en el hígado y la capilarización de los sinusoides hepáticos, debido al exceso de matriz en el espacio de Disse, da lugar a la formación de una barrera que impide la correcta difusión de oxígeno y nutrientes, provocando la muerte de los hepatocitos y favoreciendo los fenómenos de hipoxia y angiogénesis [87, 88].

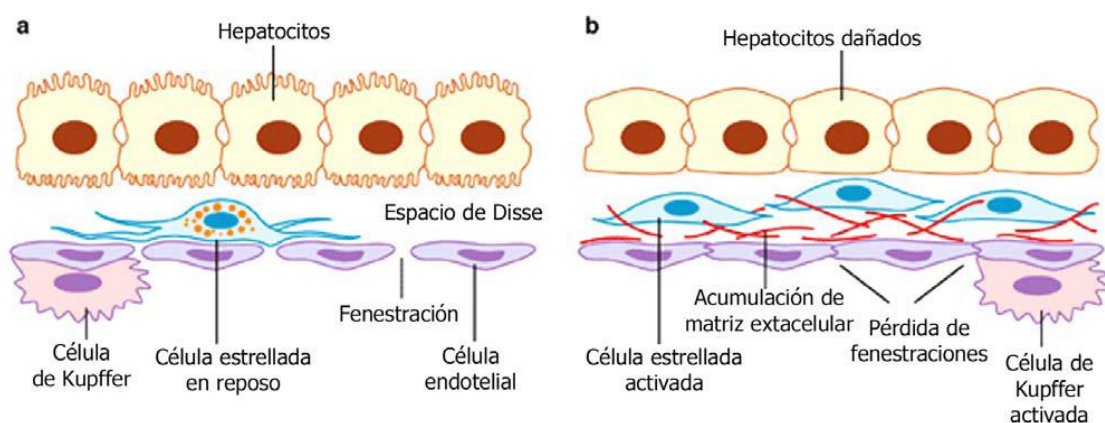


Figura 5. Patofisiología de la fibrosis. Esquema del proceso de capilarización de los sinusoides a) Situación normal b) Fibrogenesis (Modificado de Friedmann SL, Medscape General Medicine 4(3), 2002.)

2.2.2 La angiogénesis en el hígado

La angiogénesis o desarrollo de nuevos vasos sanguíneos es un proceso normal, necesario para la reparación tisular y el restablecimiento del flujo sanguíneo tras la lesión. Se trata de un proceso altamente controlado mediante quimiocinas inhibidoras o

angiostáticas, versus favorecedoras o proangiogénicas. Sin embargo, ante una enfermedad crónica, el organismo pierde el control sobre este proceso y, como consecuencia, se establecen estados patológicos debidos al exceso o déficit de angiogénesis [89].

La hipoxia y la inflamación son los principales factores inductores del proceso de angiogénesis y neovascularización, y son fenómenos comunes en la HCC. La hipoxia promueve la angiogénesis gracias a la activación de los factores de transcripción dependientes de hipoxia (HIF) [90]. La hidroxilación de HIF1- α mediada por HPHs y FIH1 (hidroxiprolina hidroxilasa y asparaginil hidroxilasa, repectivamente) es inhibida de manera progresiva, lo que reduce de forma considerable su degradación por parte de los proteosomas. Como consecuencia, HIF1- α se acumula en el citosol facilitando la formación de los heterodímeros con la subunidad HIF- β ; una vez translocados al núcleo, los complejos de transcripción se unen a las secuencias de respuesta a hipoxia (HREs), modulando la expresión de multitud de genes promotores de angiogénesis.

La formación de nuevos vasos sanguíneos es un proceso que requiere de una regulación precisa de diferentes moléculas efectoras que controlan cada una de las fases:

a) Generación de nuevos vasos “*Sprouting and budding*”: el tejido lesionado secreta factores angiogénicos como NO, VEGF y FGF que activan a los tejidos circundantes, principalmente a las células endoteliales de los vasos próximos preexistentes. El NO posee propiedades angiogénicas y es el principal factor responsable de la vasodilatación [91-93], mientras que el VEGF aumenta la permeabilidad vascular para facilitar el tránsito molecular y celular hacia el foco inflamatorio. La primera etapa de germinación requiere la vasodilatación dependiente de NO y la pérdida de las uniones tanto intra como interendoteliales. Estos fenómenos

permiten la extravasación de las proteínas plasmáticas que, junto con las proteínas de ME facilitan la fijación de un andamio provisional para la migración de células endoteliales (CEs).

b) Degradación de la ME y migración de CEs: la activación endotelial promueve asimismo la remodelación de la lámina basal (LB, formada principalmente por colágeno tipo IV y laminina) y de la ME (colágeno tipo I y elastina); estas estructuras deben sufrir una degradación para posteriormente permitir la migración y proliferación de las CEs destinada a la formación de nuevas estructuras vasculares. Adicionalmente, se ha de formar nueva ME para estabilizar las nuevas estructuras. Se trata de procesos fisiopatológicos con fases de regresión, que transcurren con una degradación activa de componentes de la ME, y otras de progresión, en las que se acumula la misma. La remodelación de la ME es por lo tanto un proceso que ha de estar cuidadosamente regulado no sólo en el tiempo, sino también en el espacio. La degradación de ME se debe a la activación de proteasas específicas que incluyen plasminógeno, metaloproteasas de matriz (MMPs) y sus inhibidores específicos (TIMPs), heparinasas y catepsinas. Estas proteasas pueden facilitar la migración de CEs promoviendo la liberación de otros factores angiogénicos como VEGF, B-FGF y TGF- β 1 [94, 95].

c) Proliferación de las CEs, organización tridimensional y ramificación de nuevos vasos: las CEs proliferan en respuesta a factores de crecimiento mitogénicos tales como VEGF, FGF básico y ácido, el HGF y TGF- α y TGF- β . El estímulo más importante es el VEGF, secretado por las propias CEs o por células circundantes, tales como las CEHs, los leucocitos, hepatocitos y células de Kupffer [85]. El VEGF actúa principalmente en las células a través de sus receptores de tipo 1 (VEGFR-1 o Flt-1) y tipo 2 (VEGFR-2 o Flk-1). Otros estímulos positivos para la proliferación de la CEs son

las citocinas, ciertas quimiocinas, y las hormonas y mediadores lipídicos; mientras que los mediadores capaces de inhibir la proliferación de las CEs incluyen IFN- β , antitrombina III, factor derivado de plaquetas 4, factor inhibidor de leucemia, que junto con angiostatina y endostatina representan los péptidos más eficaces en la supresión de la proliferación de CEs [89].

Una vez que las CEs proliferan y se ensamblan de manera ordenada, comienza la activación de otros mediadores y rutas de señalización, necesarios para la organización tridimensional de los vasos primitivos y para su conversión en vasos maduros. El primer paso es la formación de una luz en el vaso naciente que es regulado principalmente por la acción del VEGF, angiopoyetina1 (Ang1) y las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$, mientras que la trombospondina actúa como antagonista principal de este paso angiogénico [96]. En resumen, la organización tridimensional de una red vascular eficiente, requiere una orquestada regulación de los mediadores y vías de señalización que determinan los procesos de: migración y diferenciación, ramificación organizada de los neovasos, deposición de los componentes de ME y formación de la LB [96].

d) Maduración, estabilización y mantenimiento de los neovasos: la maduración de los neovasos requiere la asociación progresiva de los pericitos y la formación de una nueva LB y ME que proporcionen estabilidad estructural [97]. Este es un fenómeno crucial que también está involucrado en la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de las CEs, así como en el establecimiento del flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular. Una angiogénesis eficaz requiere de una correcta estabilización de los neovasos y la formación del lumen y de las uniones interendoteliales. La unión de Ang1 a su receptor Tie2, estabiliza los nuevos vasos modulando moléculas de adhesión [98] y facilitando la comunicación entre las CEs y las células murales [99]; sin embargo, un exceso de Ang1 aumenta la rigidez e inhibe la

ramificación de los vasos. La angiopoyetina-2 (Ang2) puede mediar efectos opuestos: en ausencia de VEGF, se contrapone a Ang1, desestabilizando con ello los vasos, induciendo la muerte de las CE y conduciendo a la regresión; en presencia de VEGF, en cambio, facilita la ramificación de los vasos [99, 100].

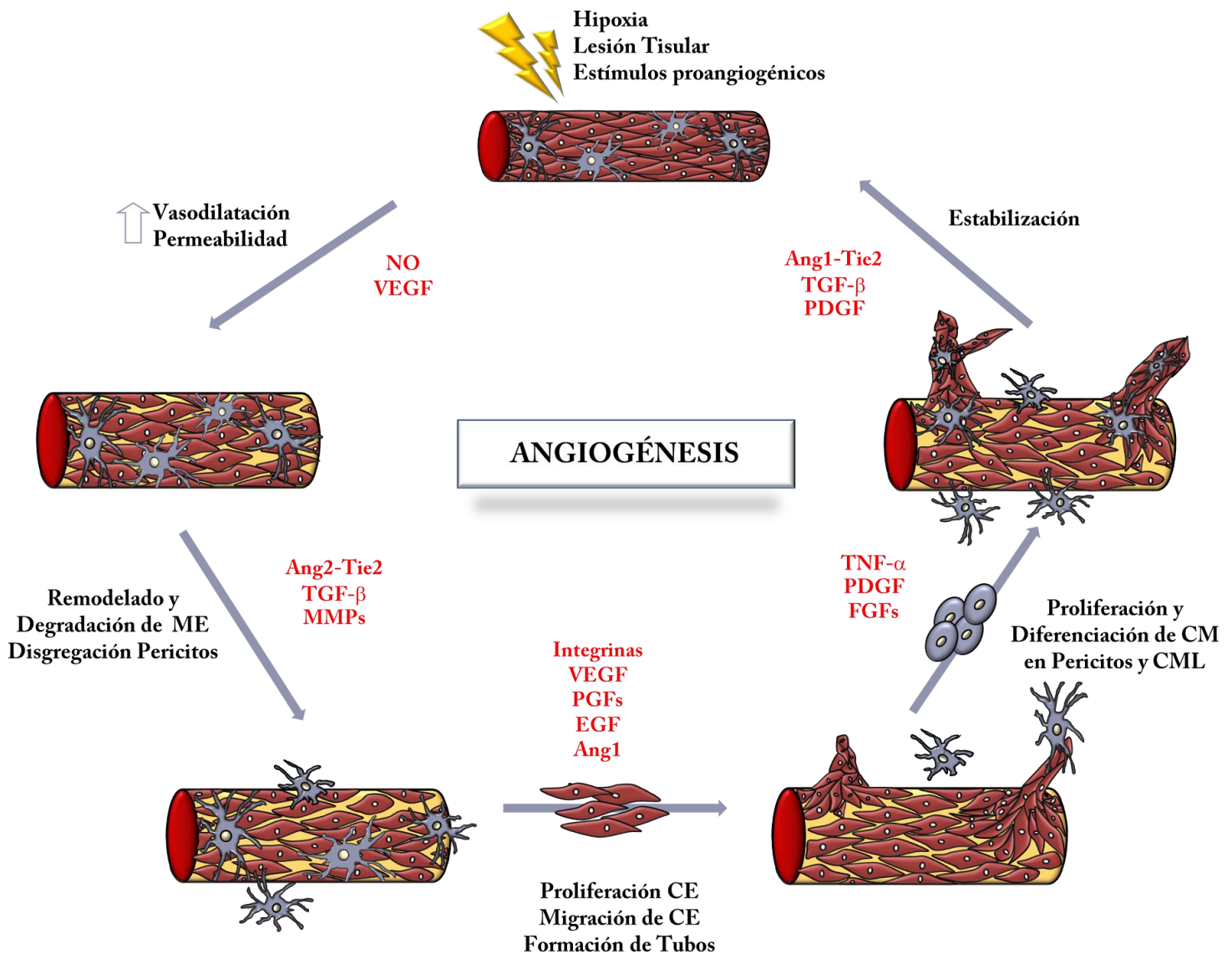


Figura 6. Fases del proceso de angiogénesis. (ME: Matriz extracelular, CE: células endoteliales; CM: células mesenquimales, CML: células de músculo liso).

2.2.3 Sistema angiopoyetinas/Tie2

El sistema angiopoyetinas/Tie2 constituye uno de los principales mecanismos de regulación de la quiescencia vascular. Dentro de la familia de las angiopoyetinas, las mejor caracterizadas son las angiopoyetinas 1 y 2. Ambas se unen al mismo receptor con actividad tirosín-kinasa denominado Tie2. La unión de Ang1 a Tie2 promueve su fosforilación, circunstancia que fomenta la estabilidad vascular al mantener las interacciones recíprocas entre el endotelio y la matriz subyacente, además de actuar como factor antiapoptótico en las células endoteliales; en cambio, la Ang2 es un antagonista natural que compite con la Ang1 en su unión al receptor Tie2 [101] impidiendo su autofosforilación y permitiendo la desestabilización vascular [101]. A pesar de haber sido inicialmente descrito como receptor endotelial y de células madre hematopoyéticas, existen numerosas evidencias que demuestran la expresión de Tie2 en otros tipos celulares [102].

Cada vez existen más evidencias respecto al aumento de la expresión tisular de Ang2 en situaciones patológicas, tanto tumorales como inflamatorias crónicas. Se ha descrito un marcado incremento en la expresión de Ang2 en las áreas de tumoración hepáticas en relación al tejido no tumoral adyacente, frente a una expresión similar de Ang1 en ambas zonas. Asimismo, se ha comprobado que la expresión de Ang2 se correlaciona con el fenotipo hipervascularizado de los hepatocarcinomas. [103]. El grupo de Fiedler y colaboradores caracterizaron uno de los mecanismos por los que el sistema angiopoyetinas/Tie puede modular la respuesta inflamatoria. Estos autores observaron la influencia que ejerce la Ang2 en la adhesión leucocitaria al analizar la respuesta del endotelio vascular a la acción mediada por TNF en ratones deficientes para el gen de la Ang2 [104]. Sus conclusiones indicaron la capacidad de la Ang2 para sensibilizar a las células endoteliales para la acción de las citocinas proinflamatorias.

También se ha relacionado la expresión de la Ang2 con la capacidad invasiva de las células tumorales de gliomas humanos mediante la inducción de la metaloproteasa de matriz extracelular MMP2 [105].

Nuestros resultados y los obtenidos por otros autores indican que la infección hepatocelular por el VHC puede causar el desequilibrio de la expresión de múltiples factores al afectar importantes rutas de señalización celular, entre las que se encuentran el sistema angipoyetinas/Tie2, crucial para la regulación inmunológica y el remodelado tisular [85, 93, 100, 106-112].

3. PAPEL PATOGÉNICO DE LOS MONOCITOS EN LA PROGRESIÓN DE LA HCC

3.1 MONOCITOS Y SUS SUBTIPOS

Como se ha descrito anteriormente los monocitos juegan un papel esencial en la inmunidad innata; sin embargo, también desempeñan un papel fundamental en la activación de la respuesta inmune adaptativa y constituyen uno de los mediadores inmunológicos más importantes del remodelado vascular, tanto fisiológico como patológico [5-8] .

Recientemente se ha establecido la heterogeneidad de este subgrupo de células mieloides periféricas, ya que son capaces de lograr un amplio espectro de funciones por la contribución específica de los diferentes subgrupos de monocitos en las distintas etapas de la respuesta inmune y en la formación y maduración de la vasculatura [9-12].

Hasta ahora, las diferentes subpoblaciones de monocitos han sido caracterizadas por la expresión en superficie de diversos marcadores, de manera que se han dividido en dos

grandes grupos en función de la expresión del receptor CD14 del lipopolisacárido (LPS) y el receptor CD16 (Fc γ RIII) [5].

Las células CD14⁺CD16⁻ forman el grupo de “monocitos clásicos” y representan el 90-95% del total de monocitos periféricos en un individuo sano; expresan CCR2, CD64 y CD62L, y su función principal es eliminar los neutrófilos apoptóticos en los lugares de inflamación [12]. El término de “monocitos proinflamatorios” está asociado a aquella población que expresa Fc γ RIII (CD14⁺CD16⁺), produce bajos niveles de IL-10 y secreta grandes cantidades de TNF- α en respuesta a los agonistas de TLR4 y TLR2 [9-11]; esta población representa el 5-10% del total de monocitos en sangre periférica. Estos monocitos exhiben una mayor capacidad de expresión de citocinas proinflamatorias, una mayor efectividad para la presentación antigénica y una mayor capacidad de extravasación, hechos que podrían explicar su frecuente asociación con la etiopatogénesis de múltiples enfermedades [113-115].

Se ha descrito en un modelo de tráfico trans-endotelial que estos monocitos poseen la capacidad de diferenciarse en CDs, actuando por lo tanto como precursores fisiológicos de CDs de fenotipo migratorio [115]. Otros estudios demuestran que las diferentes subpoblaciones de monocitos también difieren en la expresión de los receptores de las quimiocinas CCR5 y CX3CR1, que se expresan notablemente en la población de monocitos CD14⁺CD16⁺, mientras que la expresión de CCR2 y bajos niveles de CX3CR1 son característicos de los denominados “monocitos clásicos” CD14^{hi}CD16⁻ [113, 114, 116]. La expresión diferencial de éstos receptores de quimiocinas y de diversas moléculas de adhesión en los monocitos, puede tener importantes consecuencias en la funcionalidad de estas células, confiriéndolas no sólo diferentes patrones migratorios sino también diferente respuesta a la infección [113, 114, 116, 117].

Otro subconjunto de monocitos periféricos, que se define por la expresión del receptor tirosina cinasa Tie-2, denominados TEMs (de "Tie-2 expressing monocytes"), presentan un marcado potencial proangiogénico y están íntimamente involucrados en el remodelado vascular. Este tipo de monocitos se caracteriza por su inmadurez e incapacidad de presentación antigénica por lo que se les ha atribuido propiedades inmunosupresoras. Los TEMs tienen la capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares como macrófagos o células endoteliales, siendo capaces de secretar numerosas citocinas, factores de crecimiento y metaloproteasas en función del microambiente tisular. Por tanto, juegan un papel fundamental en la etiopatogenia de numerosas enfermedades inflamatorias crónicas y tumorales. Se ha descrito que estos monocitos no expresan CD62L, una molécula de adhesión de la familia de las selectinas que facilita el *rolling* de los leucocitos inflamatorios a lo largo del endotelio vascular, ni CCR2 [118], el receptor de CCL2 (también conocido como proteína quimiotáctica de monocitos 1 o MCP-1) que es la quimiocina más importante para el reclutamiento de monocitos a los tejidos inflamados y tumores. Por lo tanto, los TEMs son atraídos a los lugares con alta actividad proangiogénica en un circuito no dependiente de CCR2, reclutados probablemente por un gradiente de concentración de los ligandos de Tie2 (Angiopoyetinas).

La inmadurez o incapacidad de los TEMs para mediar la presentación antigénica ha caracterizado a este subgrupo de monocitos como un tipo de células del sistema inmune innato con capacidad inmunosupresora que parece estar principalmente comprometido con el remodelado tisular debido a sus notables propiedades proangiogénicas [118].

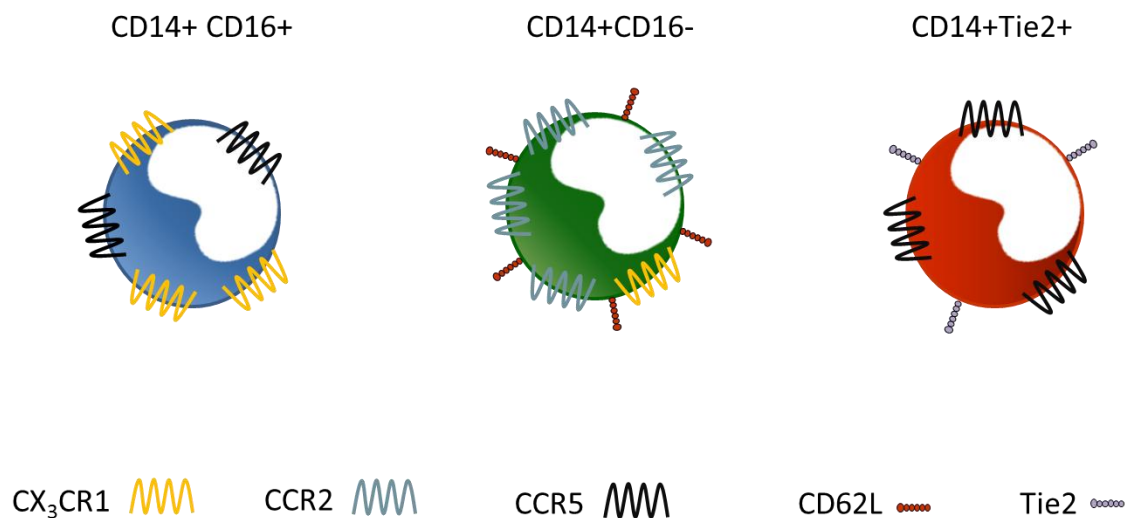


Figura 7. Subpoblaciones de monocitos en sangre periférica

3.2 MONOCITOS, INFLAMACIÓN Y FIBROSIS

En los últimos años diversos estudios han descrito el papel crucial de los monocitos infiltrados en la progresión de la fibrosis hepática en modelos de experimentación animal [119-124]. Se ha comprobado que la población de macrófagos residentes del hígado (células de Kupffer) es renovada constantemente gracias a la aportación de monocitos desde la sangre periférica [123, 125] y que, tras el daño hepático crónico, dicha población se ve enriquecida por el reclutamiento de un enorme número de monocitos infiltrados [119, 121]. Durante la progresión de la fibrosis en ratones, los macrófagos derivados de monocitos producen grandes cantidades de citocinas que perpetúan la inflamación crónica; además activan a las CEHs, lo que resulta en su proliferación y su diferenciación hacia miofibroblastos productores de colágeno [121, 122, 124].

Zimmerman y colaboradores observaron el aumento de la población de monocitos CD14+CD16+ tanto en la sangre periférica como en el hígado de individuos afectados por hepatopatía crónica de diferente etiología. De igual manera, el grupo de Heymman y colaboradores demostraron que los pacientes con cirrosis, presentan un incremento de la población de monocitos/macrófagos intrahepáticos debido fundamentalmente a la contribución selectiva de monocitos CD14+CD16+ [123]. La capacidad de estos monocitos de activar CEH en co-cultivo y su potencial para producir grandes cantidades de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-2, IFN- γ indican el papel fundamental de esta subpoblación en la persistencia de la inflamación crónica y la patogénesis de las hepatopatías crónicas.

3.3 IMPLICACIÓN DE LOS MONOCITOS EN LA CARCINOGENÉISIS

En los tumores, los monocitos son reclutados desde el torrente sanguíneo hacia los tejidos lesionados, donde se extravasan a través de la vasculatura, y comienzan a diferenciarse a macrófagos [126]. Varios estudios han señalado la capacidad de algunos subtipos de macrófagos, denominados “TAMs” (de macrófagos asociados a tumores), de promover tanto la angiogénesis como la metástasis. Los TAMs favorecen la neovascularización para proporcionar al tumor el soporte necesario de oxígeno y factores, pero además, promueven la migración y la intravasación de las células tumorales en una red vascular permeable e hipercapilarizada favoreciendo su dispersión hacia otros órganos [127].

Asimismo, determinadas señales derivadas de los tumores, entre las que destaca la hipoxia [128], promueven el reclutamiento de los TEMs. La hipoxia induce factores de transcripción (HIF) en estas células que favorecen la expresión de factores angiogénicos como el VEGF, cuya acción aumenta la angiogénesis en estas áreas. Por lo tanto, los

TEMs desempeñan un papel esencial en la formación y maduración de la vasculatura tumoral, lo que les ha atribuido una notable importancia en la consecución de la fase angiogénica tumoral o "angiogenic switch" [129]. Además, los TEMs se distinguen claramente de TAMs, ya que desempeñan un papel crucial y no redundante en la angiogénesis tumoral. Se ha demostrado que la depleción de los TEMs impide la formación de la vasculatura tumoral, independientemente de la presencia de TAMs [130, 131].

Por otra parte, existen evidencias que indican la contribución potencial de los TEMs en la etiopatogenia de muchas enfermedades no tumorales como la retinopatía diabética, accidentes cerebrovasculares, artritis y otras enfermedades inflamatorias crónicas [132]; así, los TEMs podrían representar un elemento clave en la progresión tumoral de las enfermedades inflamatorias crónicas constituyendo un nexo fundamental entre inflamación, angiogénesis y carcinogénesis [133, 134].

3.4 INFLUENCIA DEL VHC EN LA FUNCIONALIDAD DE LOS MONOCITOS

Se ha descrito la capacidad de diversas proteínas del VHC para alterar la secreción de citocinas por parte de los monocitos. El grupo de Abe y colaboradores ha descrito la modulación de la señalización mediada por TLR en una línea celular de macrófagos que expresan proteínas del VHC. Distintos genotipos de la proteína NS5A se unen al adaptador de TLR, MyD88, inhibiendo su unión al receptor asociado cinasa de la IL-1 (IRAK1) y alterando la producción de citocinas en respuesta a ligandos de TLR [135]. Se ha observado que la transfección de las proteínas NS3, NS3/4, o NS5B/NS5A en macrófagos de ratón inhibe la inducción de IL-6 mediada por diferentes ligandos de TLR [135]. Estos hallazgos indican una posible vía de interacción del VHC con la inmunidad innata. Los resultados de estos estudios "*in vitro*" están en línea con

observaciones previas que describían el aumento de la producción de citocinas pro-inflamatorias en los monocitos y macrófagos de pacientes con HCC, en respuesta a la estimulación TLR2 o TLR4 [136, 137]. Las proteínas Core y NS3 del VHC pueden inducir la expresión de $\text{TNF-}\alpha$, IL-10 y de IL-12 en los monocitos e inhibir la función aloestimuladora de las CDs [79]. Otros estudios han descrito la capacidad de Core y NS3 de mediar la inflamación y activación de NFkB a través de la vía del TLR2 [138]. De forma interesante también se ha descrito la capacidad de Core de estimular la producción de IL-6 y de IL-8 en los monocitos mediante la estimulación de TLR2 [139].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los monocitos conforman un grupo heterogéneo de células de origen mieloide que desempeñan un amplio rango de funciones, tanto inmunoreguladoras como de remodelado vascular. En el presente estudio se hipotetiza que la infección crónica por VHC podría provocar la alteración fenotípica y funcional de los monocitos de sangre periférica, ejerciendo un importante papel en la etiopatogenia de la enfermedad al alterar diversos fenómenos que acontecen durante la progresión de la HCC: inflamación, fibrosis y angiogénesis. Por tanto, la caracterización detallada de la distribución y funcionalidad de las diferentes subpoblaciones de monocitos periféricos, así como de las células derivadas de los mismos, puede constituir un importante marcador de progresión de la enfermedad y representar una nueva diana de intervención terapéutica.

OBJETIVOS

1. Estudiar comparativamente la composición de las distintas subpoblaciones de monocitos periféricos en pacientes con HCC y voluntarios sanos analizando en los pacientes su valor pronóstico de progresión de la HCC y de la respuesta al tratamiento antiviral combinado de Peg-IFN+RIB.
2. Analizar la expresión de diversos factores angiogénicos y de remodelado tisular en los monocitos de pacientes con HCC y controles sanos.
3. Estudiar la contribución de estos monocitos en el infiltrado inflamatorio y en el establecimiento de las características estructuras microvasculares intrahepáticas anómalas.

4. Determinar el papel del sistema angiogénico Ang/Tie2 en la regulación de capacidad quimiotáctica de los monocitos periféricos de pacientes con HCC y sujetos sanos.
5. Analizar la expresión y funcionalidad del sistema Ang/Tie2 durante la diferenciación “*in vitro*” de los monocitos a macrófagos y células dendríticas inmaduras y maduras.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. PACIENTES Y CONTROLES

En este estudio se incluyeron 47 pacientes diagnosticados de hepatopatía crónica causada por la infección por el VHC procedentes de la Unidad de Hepatología del Hospital Universitario de La Princesa; adicionalmente, se incluyeron 33 voluntarios sanos, con seronegatividad para el VHC. La presencia del virus en los pacientes se confirmó mediante la detección del ARN del VHC en el suero y se cuantificó la viremia a través del kit de diagnóstico Cobas Amplicor Hepatitis C Monitor Test, v2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El genotipo viral se determinó mediante el test INNO-LIPA HCV (Innogenetics, Gent, Belgium). Todos los pacientes mostraron resultados negativos para las pruebas de anticuerpos contra el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). No se observó reactividad de autoanticuerpos en ninguno de los pacientes o controles incluidos en este estudio. La detección de autoanticuerpos (AMA, SMA, ANA, LKM1 y LC1) se realizó por inmunofluorescencia indirecta en el Servicio de Inmunología del Hospital, siendo considerados positivos los títulos superiores a 1:80.

Se obtuvo el correspondiente consentimiento informado de todas las personas incluidas en la investigación. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario de La Princesa y se llevó a cabo de acuerdo con los principios expresados en la Declaración de Helsinki.

Las características demográficas y clínicas de la población estudiada, incluyendo edad, sexo, viremia, genotipo, niveles de transaminasas, porcentaje absoluto de monocitos en sangre periférica e índices de actividad histológica, quedan reflejadas en las tablas 1 y 2.

La distribución de la población de pacientes y controles en los distintos experimentos fue la siguiente:

- Identificación de subpoblaciones monocíticas: se incluyeron 39 pacientes con HCC divididos en 3 grupos en función de su respuesta al tratamiento antiviral combinado actual: “*naïve*”, sin tratamiento farmacológico (n = 8); respondedores, que tenían una respuesta virológica sostenida al tratamiento (n = 16), y los no respondedores (n = 15), en los que la viremia persistía. El protocolo de tratamiento consistió en la administración combinada de PEG-interferón+Ribavirina. Además, un total de 24 donantes sanos, cuyas características demográficas eran similares a las de los pacientes con HCC, participaron en este estudio (Tabla 1).
- Diferenciación y maduración de monocitos: se incluyeron 8 pacientes con HCC cuyas características demográficas aparecen en la Tabla 2. Las muestras de los 9 donantes sanos participantes procedían de “*buffy coats*” del Centro de Transfusiones de Madrid (Tabla 2).

Tabla 1. Características demográficas de pacientes con HCC y controles incluidos en el estudio de las subpoblaciones de monocitos periféricos

	CONTROLES		TOTAL HCC		RESPONDEDORES		NO RESPONDEDORES		NAÍVES	
Sexo (M/F)	13/11		22/17		7/9		10/5		5/3	
	MEDIANA	RANGO	MEDIANA	RANGO	MEDIANA	RANGO	MEDIANA	RANGO	MEDIANA	RANGO
Edad (años)	46	30-82	51	32-76	46	40-67	50	32-59	59	42-76
Duración de la enfermedad (años)*	N	N	8	1-20	5	1-20	8	2-19	6	1-20
	MEDIANA	95% IC	MEDIANA	95% IC	MEDIANA	95% IC	MEDIANA	95% IC	MEDIANA	95% IC
% Total monocitos periféricos	7,8	6,5 -9,6	9,6	8,9- 10,8	10,6	8,6 - 13,2	10,2	8,6 – 11,1	7,8	6,2 -10,2
Carga Viral (U mL ⁻¹)x10 ⁵	N	N	2,7	3,7 – 11,1	0	0	4,7	4,3 -13,2	13,5	1,9 -31,0
GOT (U L ⁻¹)	15,7	12,8 –18,7	36,0	35,1 – 52,4	30,0	24,9 – 35,0	36,5	34,6 - 60,8	41,5	24,5-85,7
GPT (U L ⁻¹)	18,0	11,2 –29,5	39,5	36,6 – 64,1	28,0	21,1 – 36,0	48,0	35,8 – 87,1	46,5	25,4 -99,0
G-GT (U L ⁻¹)	13,0	5,8 – 27,3	45,0	45,6 - 75,5	38,0	23,3 – 63,2	45,0	40,8 – 87,2	58	32,8 -129,6
Indice de actividad Histológica										
Estadio	N	N	2	1,5 - 2,6	2,5	1,3 - 3,6	2	1,0 - 2,4	N	N
Grado	N	N	2	1,5 - 2,7	2	1,2 - 3,7	2	1,2 - 2,4	N	N

IC, intervalo de confianza; HCC, hepatitis crónica C; N, sin dato; GOT, transaminasa glutámico oxalacética; GPT, transaminasa glutámico-pirúvica; G-GT, gamma-glutamyl transpeptidasa.

*La duración de la enfermedad fue calculada como los años transcurridos desde el momento del diagnóstico de la infección por el VHC hasta la realización del presente estudio.

Tabla 2. Características demográficas de pacientes con HCC incluidos en el estudio de diferenciación y maduración de monocitos

	PACIENTES HCC	
Sexo (M/F)	8/0	
	MEDIANA	RANGO
Edad (años)	54	41 - 74
	MEDIANA	95% IC
% Total monocitos periféricos	8,6	7,1 - 10,2
Carga Viral (U mL ⁻¹)x10 ⁵	11,5	4,5 - 18
GOT (U L ⁻¹)	59,5	36,2-90,5
GPT (U L ⁻¹)	69	41,5 - 100,6
G-GT (U L ⁻¹)	122	48,68 – 228, 3
FOSFATASA ALCALINA	78	64 - 108,9

2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y CULTIVOS

2.1 Aislamiento de monocitos de sangre periférica

Para el estudio de las diferentes subpoblaciones de monocitos de sangre periférica, las células mononucleares se aislaron a partir 20 mililitros (ml) de sangre heparinizada tanto de pacientes con HCC como de individuos sanos.

En los experimentos de diferenciación y maduración a partir de monocitos se emplearon muestras de sangrías de 400 ml en el caso de los pacientes con HCC y de concentrados leucocitarios (*buffy coat*) en el caso de los voluntarios sanos, ya que se necesitaba un mayor volumen de muestra para la realización de estos ensayos. Para ello, la sangre previamente diluida 1:2 en suero fisiológico, se distribuyó en tubos de 50 ml que contenían 15 ml de ficoll (Ficoll Hypaque, Sigma Co, St Louis, USA). Posteriormente las muestras se centrifugaron con un gradiente de densidad a 1500 g sin freno y a temperatura ambiente durante 45 minutos.

Las células mononucleares se recogieron en la interfase entre plasma y ficoll, y se lavaron tres veces con buffer fosfato salino (PBS). Finalmente, los monocitos fueron aislados mediante selección positiva con microesferas magnéticas acopladas a anticuerpo anti-CD14 (Miltenyi Biotec, Auburn, USA). La viabilidad y el número de monocitos obtenidos se determinó mediante tinción con azul tripán y recuento celular en cámara de Neubauer, respectivamente. La pureza de los monocitos se confirmó mediante tinción con anticuerpos monoclonales anti-CD14 y anti-CD3 humano conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC; BD Biosciences, San Jose, CA) y el correspondiente análisis de citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San José, CA), con una eficiencia superior al 98%.

Los monocitos aislados por el procedimiento descrito anteriormente fueron cultivados a una densidad de 10^6 células por ml en medio RPMI 1640 (Life Technologies, Merelbeke, Bélgica), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y 100 U/ml de penicilina.

2.2 Diferenciación de monocitos de sangre periférica a macrófagos y células dendríticas

Los monocitos en cultivo se suplementaron con factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF 1000 U/ml) o con GM-CSF e Interleucina 4 (IL-4, 1000 U/ml) para obtener macrófagos derivados de monocitos (MDMs) y células dendríticas derivadas de monocitos (CDDMs), respectivamente. Estos estímulos se añadieron a las 0, 48 y 96 horas desde el momento en el que monocitos se pusieron en cultivo, para finalmente utilizar las células de forma rutinaria a los 5-6 días según los casos.

Las CDDMs maduras se obtuvieron a las 24 horas tras añadir a los cultivos de CDDMs lipopolisacarido (LPS) a una concentración de 0.1 µg/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA).

3. CITOMETRÍA DE FLUJO

3.1 Preparación de muestras

El análisis de la expresión de diversos marcadores de superficie específicos de cada tipo celular, así como de diferenciación y maduración se realizó por citometría de flujo inmediatamente después del proceso de aislamiento en los monocitos, mientras que en el caso de las células derivadas de monocitos se realizó tras su diferenciación/maduración.

Las células fueron recolectadas, centrifugadas, resuspendidas y fijadas con paraformaldehído 4 % durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se lavaron y se bloquearon con gamma globulina diluida en PBS durante 10 minutos, para así evitar uniones inespecíficas. Las células se incubaron con anticuerpos específicos acoplados a fluorocromos (diluidos en PBS) durante 30-45 minutos a 4°C y en oscuridad. En el caso de los anticuerpos no acoplados a fluorocromo o indirectos, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario durante 1 hora, y tras realizar un lavado, con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a fluorocromo durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente las células se lavaron con PBS frío y los niveles de expresión se analizaron con un citómetro FACSCalibur (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA).

Se realizaron controles negativos para cada uno de los experimentos utilizando anticuerpos con el mismo isotipo, pero especificidad irrelevante, conjugados con – APC,-FITC y –PE (Becton Dickinson Mountain View, CA.).

3.2 Anticuerpos utilizados en la citometría de flujo

Los distintos tipos celulares se marcaron con los siguientes anticuerpos:

- **Monocitos:** CD3-FITC (HIT3a), CD14-APC (MoP9), CD16-FITC (3G8) (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) y Tie2-PE (83715) (R&D, Systems, Minneapolis, USA).
- **Macrófagos:** CD16-FITC (3G8) (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA), anticuerpo anti-Tie2-PE (R&D, Systems, Minneapolis, USA) y anti-CD11b (Bear-1/cedido por el Dr. Sánchez Madrid).
- **Células dendríticas:** CD80-FITC (L307.4), CD83-FITC (HB15e), CD86-FITC (2331(FUN-1)) (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) y anticuerpos anti-Tie2-PE (R&D, Systems, Minneapolis, USA) y anti-MHC clase II (TS1/2/cedido por el Dr. Sanchez Madrid).

3.3 Análisis de las poblaciones monocíticas

Las poblaciones de monocitos circulantes en sangre periférica fueron identificadas mediante citometría de flujo usando el sistema FACSCalibur y se analizaron usando el software Cellquest (ambos Becton Dickinson, san Jose, CA, USA). Las subpoblaciones de estudio se seleccionaron de manera secuencial escogiendo una serie de regiones que delimitaban los grupos de la forma siguiente:

- Paso 1. En primer lugar, se realizó un "gating" de células en función del tamaño (FSC/forward scatter) y complejidad (SSC/side scatter), eliminando el *debris* (células adheridas o lisadas) y dejando los leucocitos que se iban a analizar. Así seleccionamos la población de monocitos general en la G1 (gate 1 ventana 1) como queda representado en el diagrama de puntos de la **figura 1A**.

➤ Paso 2. A continuación los monocitos se caracterizaron mediante inmunofluorescencia doble. Para ello se seleccionaron las diferentes subpoblaciones en función de la tinción con anti-CD14, anti-CD16 y anti-Tie2, combinando los marcajes dos a dos (**Figura 1B**). De ésta manera los distintos subgrupos de monocitos quedaron limitados en las siguientes regiones, según el marcaje simultáneo de A y B, donde A puede representar CD14 o Tie2 y B puede representar CD16 o Tie2:

- G2: Monocitos positivos para A y negativos para B (A+B-).
- G3: Monocitos positivos para A y B (A+B+).
- G4: Monocitos con baja expresión de A y negativos para B (A- B-).
- G5: Monocitos con baja expresión de A y positivos para B (A- B+).

➤ Paso 3. El análisis multiparamétrico se llevó a cabo midiendo la expresión de Tie2 y CD16 en las diferentes subpoblaciones caracterizadas para CD14/CD16 en el primer caso, y de CD14/Tie2 en el segundo. Esta estrategia queda reflejada en los histogramas de la **figura 1C**, donde C puede representar Tie2+ o CD16+.

Se analizaron un mínimo de 40000 células por paciente y sujeto control en todos los experimentos con el fin de poder caracterizar aquellas poblaciones minoritarias.

La **figura 1** muestra el procedimiento para el aislamiento de los monocitos así como la estrategia de análisis de las diferentes subpoblaciones.

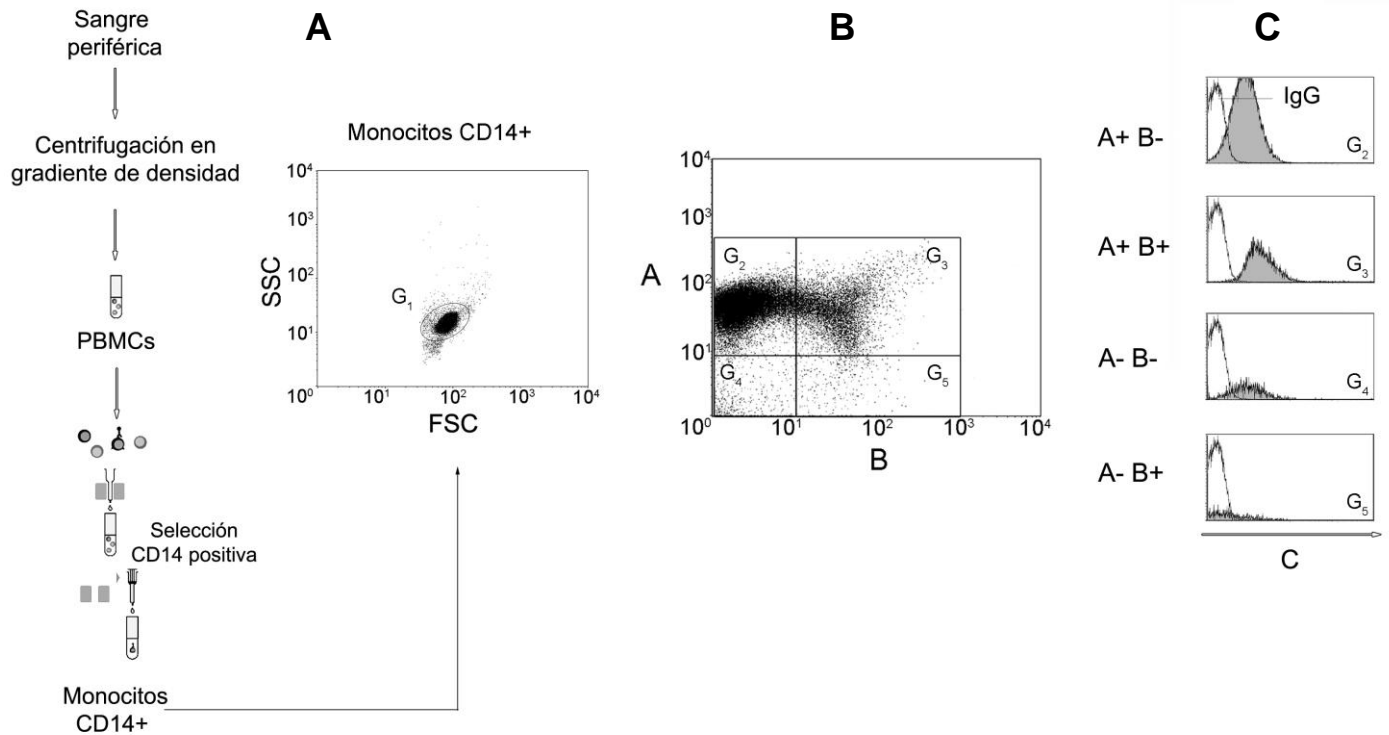


Figura 1. Selección de subpoblaciones de monocitos de sangre periférica. La primera gráfica (A) muestra la estrategia de selección de la población de monocitos totales mediante tamaño y complejidad (FSC/SSC). Las células se caracterizaron posteriormente mediante inmunofluorescencia doble (B) y triple (C), donde A y B podrían representar los marcajes de CD14, CD16 o Tie2, mientras que C sólo representa el patrón de expresión de CD16 o Tie2.

3.4 Análisis de células derivadas de monocitos (CD-Mo) mediante citometría de flujo

El análisis de la expresión de los marcadores de diferenciación y maduración celular en MDMs, CDDMs y CDDMs maduras se llevó a cabo en función del tamaño y complejidad correspondiente de cada tipo celular. La evaluación se realizó como mínimo en 10000 células, y la expresión de los diferentes marcadores se midió en función del control de isotipo adecuado para cada anticuerpo.

De esta forma, la diferenciación/maduración de los monocitos a MDMs y a CDDMs se evaluó mediante el análisis de la expresión del marcador CD11b en el primer caso, y de MHC de clase II, CD80, CD86 y CD83 en el segundo caso.

4. INMUNOFLUORESCENCIAS

4.1. Obtención de biopsias

Las muestras de tejido hepático procedían de biopsias de hígado obtenidas por motivos diagnósticos, previo consentimiento de los pacientes y de acuerdo a la Declaración de Helsinki y al Comité de Bioética del Hospital Universitario La Princesa. Las biopsias hepáticas se tomaron por técnica percutánea mediante aguja Menghini bajo control ecográfico. Estas muestras se analizaron histológicamente en el Servicio de Anatomía Patológica del hospital (Dr. Asunción García-Sánchez), clasificándose de acuerdo a la escala METAVIR. De esta manera el estadio de fibrosis se clasifica de F0 a F4: donde F0 denota la ausencia de fibrosis; F1, fibrosis periportal sin septos, F2, fibrosis portal y periportal con pocos septos, F3, fibrosis portal y periportal con abundantes septos sin cirrosis; F4, cirrosis. La actividad necroinflamatoria se registró en una escala de A0 a A3, donde A0 representa la ausencia de actividad, A1 denota actividad leve, A2 indica actividad moderada y A3 denota actividad grave.

4.2 Procesamiento del tejido

Las muestras de tejido fueron embebidas en un medio criosolidificable (OCT-Compound, Tissue-Tek 4583, Distribuidor Bayer S.A.) para congelarlas y almacenarlas inmediatamente a -80°C . Se realizaron secciones de tejido de 5 micras de espesor en el criostato y se dejaron secar durante 24 horas; posteriormente se fijaron con acetona y se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Para los experimentos de inmunofluorescencia, las secciones fueron bloqueadas con buffer de bloqueo Tris-NaCl (TNB) durante 30 minutos e incubadas con anticuerpo anti-Tie2, seguido de Alexafluor-568 (Molecular Probes, Eugene, OR).

Las células endoteliales se caracterizaron con el marcaje del correspondiente anticuerpo frente a CD31 (proporcionado por el Dr. Sánchez Madrid), seguido de Alexafluor-647 (R&D Systems, Minneapolis, EE.UU.). Los monocitos intrahepáticos se identificaron en las distintas secciones de hígado con anticuerpo anti-CD14 conjugado con -APC (BD Biosciences, California, EE.UU.). Las imágenes fueron obtenidas con el objetivo de 40x y se adquirieron tanto en el plano X-Y como en el eje Z realizando secciones consecutivas de 0.5 micras. Se utilizó un microscopio Confocal Leica TCS-SP láser de barrido equipado con rayos láser de Ar y He-Ne conectado a un microscopio Leica DMIRBE invertido de epi-fluorescencia.

4.3 Monocitos de sangre periférica

Los monocitos recién aislados tanto de los pacientes con HCC como de los controles sanos se plaquearon sobre cubreobjetos previamente incubados con poli-L-lisina hasta su completa adhesión tras 1-2 horas. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído 4% y se permeabilizaron con PBS más 0.02% Tween-20 a 37°C . Tras bloquear con TNB durante 30 minutos para evitar uniones inespecíficas, los monocitos

se incubaron con anticuerpos específicos para Ang1, Ang2 y Tie2 (Santa Cruz biotechnology, California, EE.UU.) durante 1 hora, seguidos de los anticuerpos anti-goat Alexafluor-568 o anti-rabbit Alexafluor-488 como anticuerpos secundarios (Molecular Probes, Eugene, OR).

Como control de permeabilización, los monocitos se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-tubulina alfa (clon B-5-1-2, Sigma Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) seguido de anti-goat Alexafluor-568 (Molecular Probes, Eugene, OR). Las preparaciones se analizaron por medio de un microscopio de epifluorescencia Leica (Leica, Wetzlar, Alemania) utilizando el objetivo de 40×.

4.4 Análisis de imagen

Todas las inmunofluorescencias se procesaron utilizando el software ImageJ versión 1.42q (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). En las inmunofluorescencias celulares se midió la intensidad media de fluorescencia (IMF) de Tie2, Ang1 y Ang2 a lo largo del eje de diferentes monocitos. Se analizaron al menos 5 células por campo, a lo largo de 5 campos en la preparación. Los valores finales se obtuvieron del cálculo de la mediana de cada dato menos el valor del marcaje residual del fondo de cada fluorocromo. Las tinciones de los tejidos se analizaron de la misma manera obteniendo la mediana de la IMF y de la densidad de fluorescencia integrada del marcaje de Tie2 y CD14 a lo largo del eje de los TEMs identificados.

5. CUANTIFICACIÓN DE FACTORES DE ANGIOGÉNESIS Y REMODELADO TISULAR

La secreción de citocinas y de los diferentes factores de remodelado tisular y de angiogénesis se analizó en el sobrenadante de los monocitos y células derivadas tras ser plaqueadas a una densidad constante 10^6 células por ml. En el caso de los monocitos los

medios se recogieron tras 24 horas de incubación, mientras que en el resto de tipos celulares se recolectaron tras la diferenciación /maduración de los mismos.

Los sobrenadantes obtenidos se centrifugaron durante 5 minutos a 12000 rpm, para eliminar los posibles restos celulares, y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

El estudio de la expresión de Ang1 y Ang2 se realizó en los sobrenadantes de monocitos y células derivadas mediante kit comercial de ELISA Quantikine (R&D) siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de los restantes factores de angiogénesis y de remodelado tisular se realizó mediante los arrays comerciales Quantibody Human angiogenesis Array 1 y Quantibody Human MMP-1 Array (RayBiotech, Norcross, GA). La expresión de las siguientes moléculas se midió por cuadruplicado en los sobrenadantes de pacientes con HCC y de controles: angiogenina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento básico de fibroblastos (B-FGF), el factor de crecimiento de unión a heparina EGF-like (HB-EGF), factor de crecimiento hepatocitario (HGF), leptina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), factor de crecimiento placentario (PLGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), metaloproteasas de matriz 1, 2, 3, 8, 9, 10 y 13 (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-13) e inhibidores de metaloproteasas de matriz extracelular 1, 2 y 4 (TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-4) de acuerdo a los protocolos del fabricante. La medida de la señal de fluorescencia a 565 nm se efectuó en un escáner láser Axon GenePix (Molecular Devices, LLC, California, USA).

5.1 Análisis de los datos

Los hallazgos de la fluorescencia fueron cuantificados mediante el programa RayBio Q Software Analyzer (Raybiotech, Norcross, GA). Las medidas de las muestras se

calcularon a partir de la mediana de la fluorescencia de los cuadruplicados menos la fluorescencia residual, eliminando los valores extremos. Se calculó para cada factor su correspondiente recta patrón mediante regresión lineal, siempre con una r mayor del 0.98, para finalmente obtener los datos de la concentración de cada molécula por extrapolación.

6. ENSAYOS DE INVASIÓN

Los ensayos de invasión se realizaron en placas Transwell cuyas membranas poseían un diámetro de poro de 8.0 μm (Corning, Corning, NY). Los monocitos, resuspendidos en 100 μl de medio RPMI suplementado con 0.2% de FBS, se situaron en la cámara superior a una concentración de 200 células/ μl sobre una matriz de colágeno (Pure Col, Advanced BioMatrix, California, EE.UU.) diluida en RPMI (300 $\mu\text{g/ml}$) que había sido colocada 24 horas antes del experimento. En la cámara inferior se depositó el medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 0.2% de FBS, con o sin estímulo (Ang1 y Ang2 recombinantes/R&D Systems, Minneapolis, USA) y proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1, Immuno Tools, Friesoythe, Germany), a una concentración de 100 ng/ml. Para bloquear el efecto de Ang1 y Ang2, los monocitos fueron pretratados con 4.0 ng/ml de anticuerpo neutralizante anti-Tie2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Alemania). Tras 4 horas de incubación a 37°C se retiró la matriz de colágeno y los filtros fueron fijados y teñidos con 4-6-diamidino-2-fenilindol, para detectar los monocitos que habían atravesado hacia la parte inferior de la membrana mediante el conteo de sus núcleos.

El conteo se realizó en un microscopio de epifluorescencia Leica (Leica, Wetzlar, Alemania) contabilizando 14 campos a lo largo de toda la preparación, para luego calcular el número medio de monocitos capaces de invadir la matriz de colágeno. Como

control negativo se utilizaron monocitos cultivados en medio RPMI suplementado con 0.2% de FBS, y como control positivo la adición de MCP-1 en la cámara inferior.

7. ANALISIS ESTADÍSTICO

Los datos de las proporciones de monocitos y células derivadas, y de expresión de factores angiogénicos y de remodelado, se expresaron como la mediana y percentiles 25-75% +/- el intervalo de confianza (IC) al 95%. La significación estadística de las diferencias entre el grupo control y el total de pacientes con HCC (“naïve”, respondedores y no respondedores en su caso) se determinaron por el test no paramétrico U de Mann-Whitney y los coeficientes de correlación fueron determinados por correlación de Spearman bilateral. Los valores de p por debajo de 0.05 fueron considerados significativos. Los datos fueron analizados utilizando el programa SPSS, versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES MONOCÍTICAS EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON HCC

En vista de las recientes investigaciones que demuestran la relación de los TEMs con la angiogénesis patológica asociada a determinadas enfermedades inflamatorias y tumorales, decidimos analizar de forma detallada el posible papel de los distintos subgrupos de monocitos circulantes en la etiopatogenia de la hepatopatía crónica por VHC. Para ello, seleccionamos una población de 39 pacientes con HCC y 24 donantes sanos, con el fin de caracterizar fenotípicamente los subtipos de monocitos pro-inflamatorios y pro-angiogénicos periféricos, cuya diversidad funcional podría estar implicada en la respuesta a la infección e incluso en la progresión de la HCC.

1.1 Análisis de variables clínicas

En primer lugar quisimos analizar posibles alteraciones de los parámetros clínicos en las analíticas de los pacientes con HCC incluidos en el estudio. Como era de esperar, encontramos niveles de transaminasas GOT, GPT y de GGT significativamente elevados en los enfermos en comparación con los controles. Asimismo, el porcentaje total de monocitos en sangre periférica estaba incrementado significativamente en los individuos enfermos en relación con los voluntarios sanos (* $p = 0.031$, **figura 1A**). Al estudiar este parámetro en función del tipo de respuesta al tratamiento antiviral se observó que los pacientes no respondedores presentaban niveles más altos con respecto a los controles (* $p = 0.030$, **figura 1B**). En cambio, no se apreciaron diferencias significativas en relación a los pacientes respondedores y “naïves”.

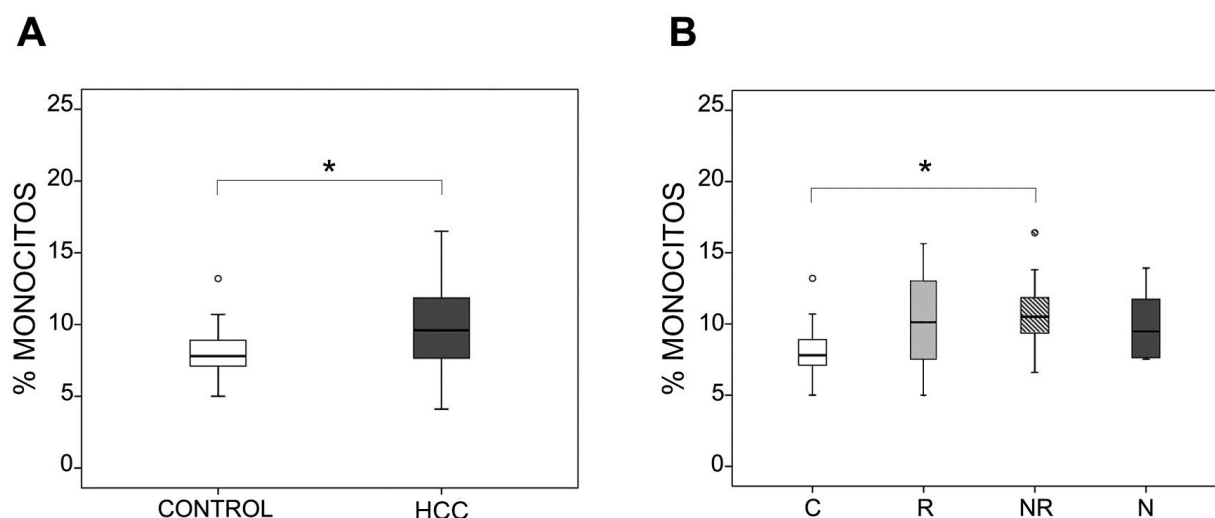


Figura 1. Porcentaje de monocitos totales en sangre periférica de pacientes con HCC y controles sanos. Los pacientes con HCC mostraron mayor proporción de monocitos periféricos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en los no respondedores respecto a los controles (* $p < 0.05$, prueba U de Mann-Whitney). Los diagramas de cajas muestran la mediana del porcentaje de monocitos totales \pm 95% de IC (A) y de monocitos en función de la respuesta al tratamiento antiviral (B). C: controles; R: respondedores; NR: no respondedores; N: Naïves.

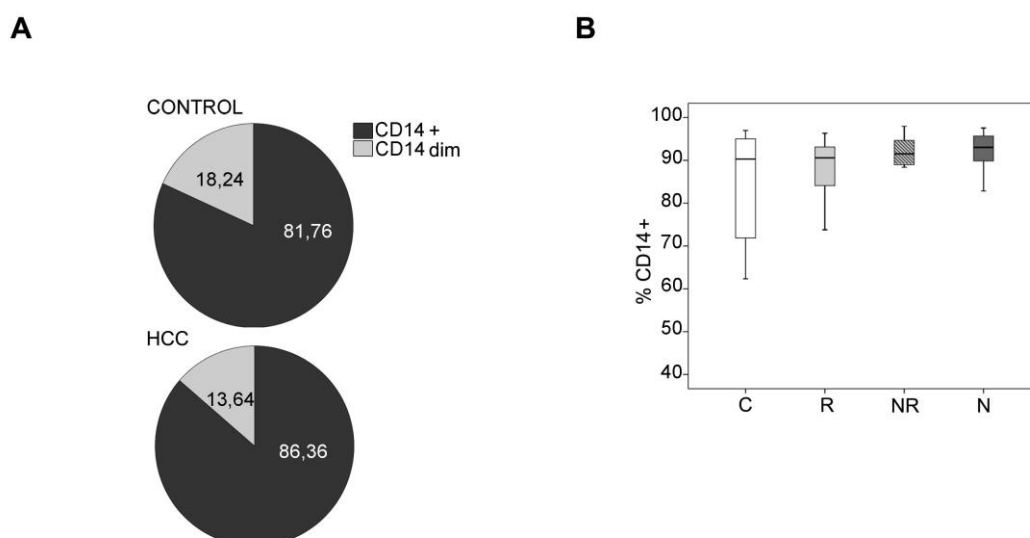
1.2 Heterogeneidad fenotípica de los monocitos en sangre periférica

Para caracterizar fenotípicamente las diferentes poblaciones de monocitos de interés estudiamos mediante citometría de flujo la expresión de los marcadores de superficie CD14, CD16 y Tie2. El aislamiento de los monocitos se realizó mediante selección positiva de las células CD14, de forma que la expresión de este marcador en los monocitos se clasificó como CD14 dim, cuando el nivel de expresión fue menor de 10 unidades de intensidad media de fluorescencia (IMF), y CD14+, cuando era superior a 10 unidades de IMF. El porcentaje de células CD14 fue similar en pacientes con HCC y

controles (**Figura 2A-B**), mientras que las poblaciones de monocitos que presentaban una alta expresión de CD16 y Tie2 estaban incrementadas de forma significativa ($p = 0.001$, ambos) en los pacientes con HCC (**Figura 2C-E**).

Cuando analizamos estos marcadores en función de la respuesta al tratamiento observamos incrementos significativos en la proporción de monocitos CD16 en todos los grupos de pacientes con HCC en relación al grupo control ($p < 0.05$, **figura 2D**). Por otra parte detectamos un importante aumento de la proporción de monocitos que expresaban Tie2 en pacientes con HCC (**Figura 2E**), notablemente superior en pacientes “naïve” y no respondedores respecto al grupo control ($p = 0.005$, y $p = 0.001$, respectivamente) y, de forma interesante, también en relación al grupo de pacientes respondedores ($p = 0.018$ y $p = 0.025$ respectivamente, **figura 2F**).

Por otra parte, no observamos ninguna relación entre los índices de actividad histológica (Metavir) y los distintos subtipos de monocitos.



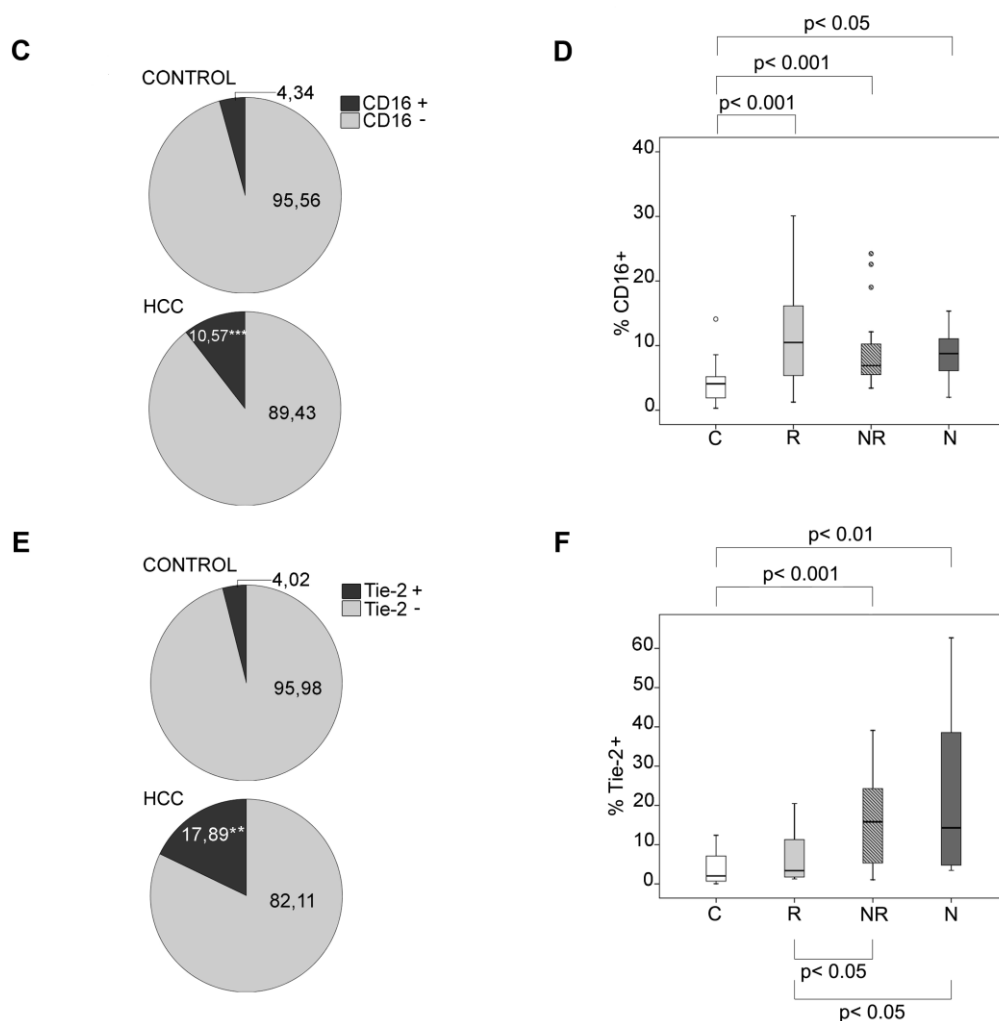


Figura 2. Expresión de CD14, CD16 y Tie2 en monocitos de sangre periférica de controles y pacientes con HCC. El gráfico de sectores muestra la proporción de monocitos con expresión de CD14+ y CD14dim (A), CD16+ y CD16- (C) y Tie2+ y Tie2- (E) de los controles y pacientes con HCC. La proporción de monocitos CD16 y Tie2 positivos aumentó significativamente en la sangre periférica de pacientes con HCC en comparación con los controles (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$, respectivamente, U de Mann-Whitney). Los diagramas de cajas muestran la mediana y los percentiles del porcentaje \pm 95% de IC de monocitos que expresan CD14 (B), CD16 (D) y Tie2 (F) en función de la respuesta al tratamiento. C: controles; R: respondedores; NR: no-respondedores; N: Naïves.

1.3 Identificación de subpoblaciones de monocitos periféricos

Los resultados anteriores nos llevaron a intentar caracterizar con más detalle los distintos grupos de monocitos. Para ello realizamos un análisis simultáneo de la expresión de los marcadores de superficie CD14, CD16 y Tie2, que reflejó marcadas diferencias en la distribución de los distintos subtipos de monocitos periféricos de pacientes con HCC en comparación con los controles sanos. En las nubes de puntos de la **figura 3** se puede observar una notable variación en la composición de monocitos en función de la enfermedad. La expresión simultánea de CD14/CD16 (**A**), CD14/Tie2 (**B**) y CD16/Tie2 (**C**) se muestra en un control y un paciente con HCC representativos. Las poblaciones mayoritarias de monocitos periféricos, tanto en los controles como en los pacientes con HCC, fueron CD14⁺/CD16⁻, CD14⁺/Tie2⁻ y Tie2⁻/CD16⁻ (**Figura 3 D, E y F**), aunque en pacientes eran notablemente inferiores a los controles. En cambio se observó un aumento importante de las subpoblaciones de monocitos pro-inflamatorios (CD16⁺) y pro-angiogénicos (Tie2⁺): los subtipos CD14⁺CD16⁺, CD14^{dim}CD16⁺, CD14⁺Tie2⁺, CD14^{dim}Tie2⁺, así como todas aquellas subpoblaciones caracterizadas para Tie2/CD16 eran superiores en los pacientes con HCC en comparación con los controles ($p < 0.01$, **figura 3F**).

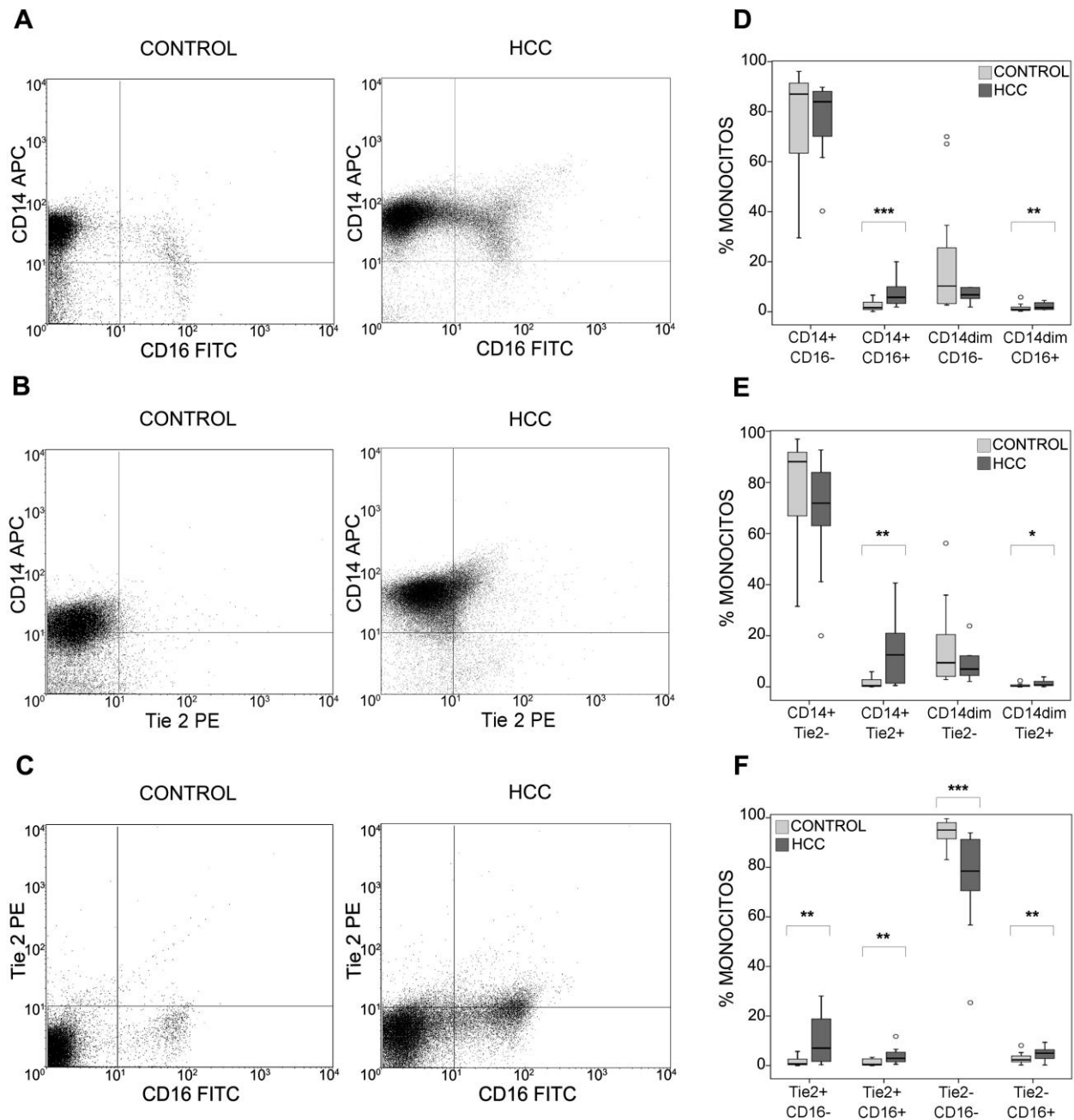


Figura 3. Doble marcaje de monocitos periféricos en controles y pacientes con HCC. Las nubes de puntos A, B y C muestran la patente modificación de la distribución de las distintas subpoblaciones de monocitos, en un control y un paciente representativos. Los diagramas de cajas D, E y F muestran la mediana +/- 95% IC de las distintas subpoblaciones CD14/CD16 (A), CD14/Tie2 (B) y Tie2/CD16 (C) analizadas en todos los controles y pacientes con HCC. El test estadístico utilizado fue la prueba de U de Mann Whitney (* para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ y *** para $p < 0.001$).

Curiosamente, la subpoblación de monocitos Tie2+/CD16- fue significativamente mayor en HCC ($p = 0.01$, **figura 3F**), especialmente en pacientes “naïve” y no respondedores ($p < 0.05$, ambos, **figura 4B**) en comparación con los respondedores y los controles ($p = 0.006$ y $p = 0.001$, respectivamente, **figura 4B**), mostrando una tendencia semejante a la de población global de monocitos caracterizados sólo para Tie2.

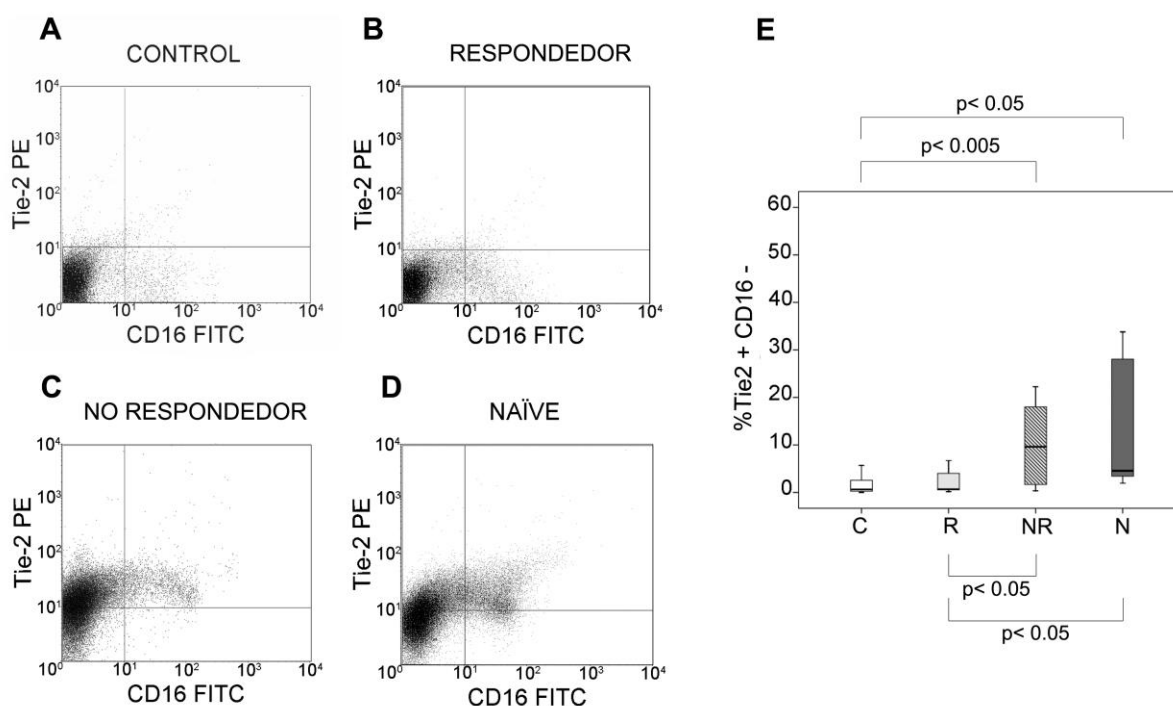
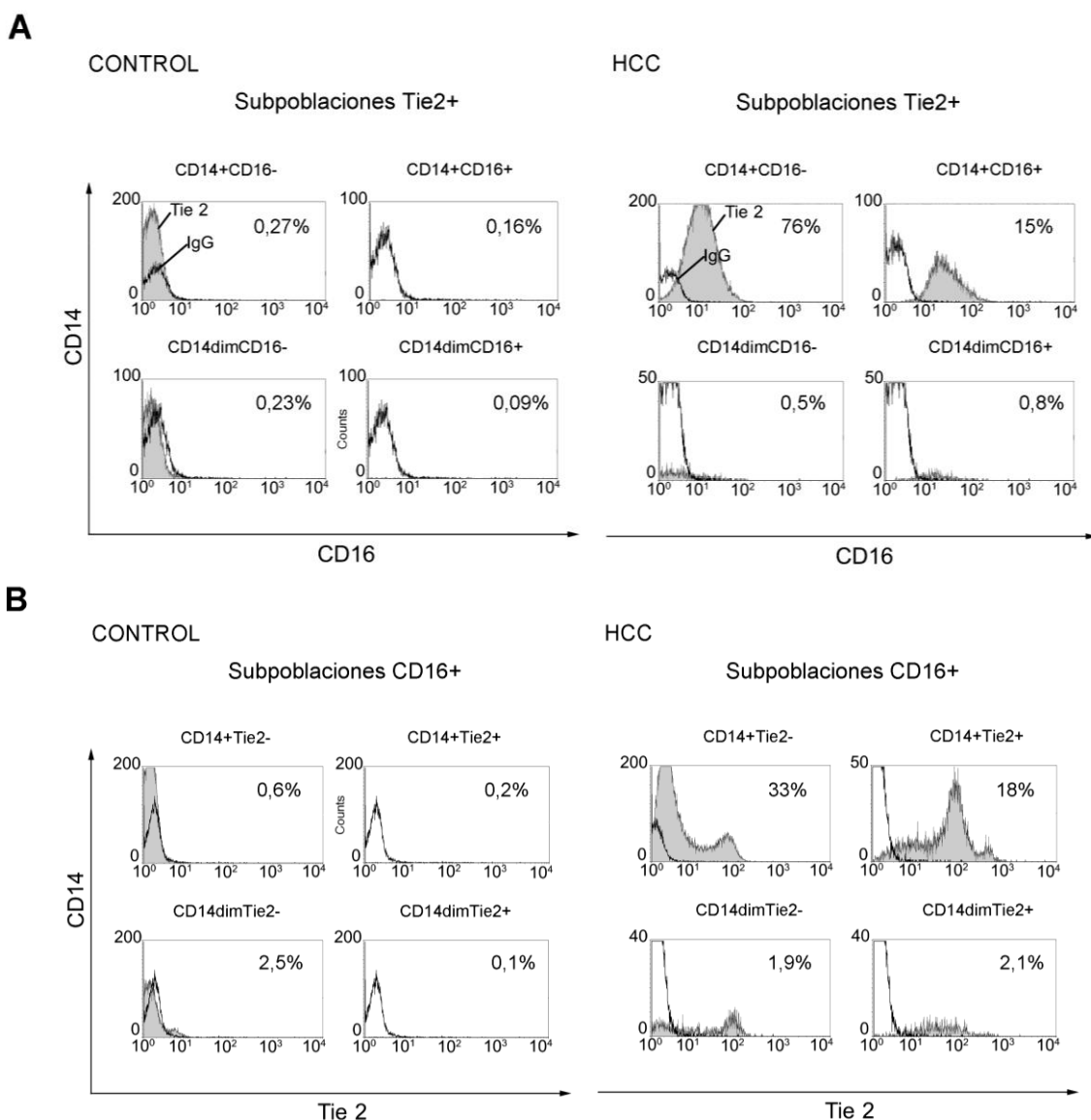


Figura 4. Polarización de las subpoblaciones de monocitos periféricos en pacientes con HCC en función de su respuesta al tratamiento. Los diagramas de puntos muestran la distribución de la expresión de Tie2/CD16 en los monocitos de un control (A), un paciente respondedor (B), un no respondedor (C) y de un “naïve” (D) representativos ($p < 0.05$, por prueba de la U de Mann Whitney). Los diagramas de cajas (E) representan la mediana del porcentaje +/- el 95% IC. C: controles; R: respondedores; NR: No respondedores; N: “Naïves”.

1.4. Caracterización multiparamétrica de las diferentes subpoblaciones de monocitos periféricos

Los resultados obtenidos indicaban que en los pacientes con HCC ocurría una clara polarización de la población general de monocitos periféricos hacia los fenotipos más pro-inflamatorios y pro-angiogénicos; sin embargo, quisimos caracterizar simultáneamente la expresión de todos los marcadores. Para ello, seleccionamos de manera específica la población Tie2⁺ y CD16⁺ en las distintas poblaciones caracterizadas para CD14/CD16 (**Figura 5A**) en el primer caso, y CD14/Tie2 (**Figura 5B**) en el segundo.



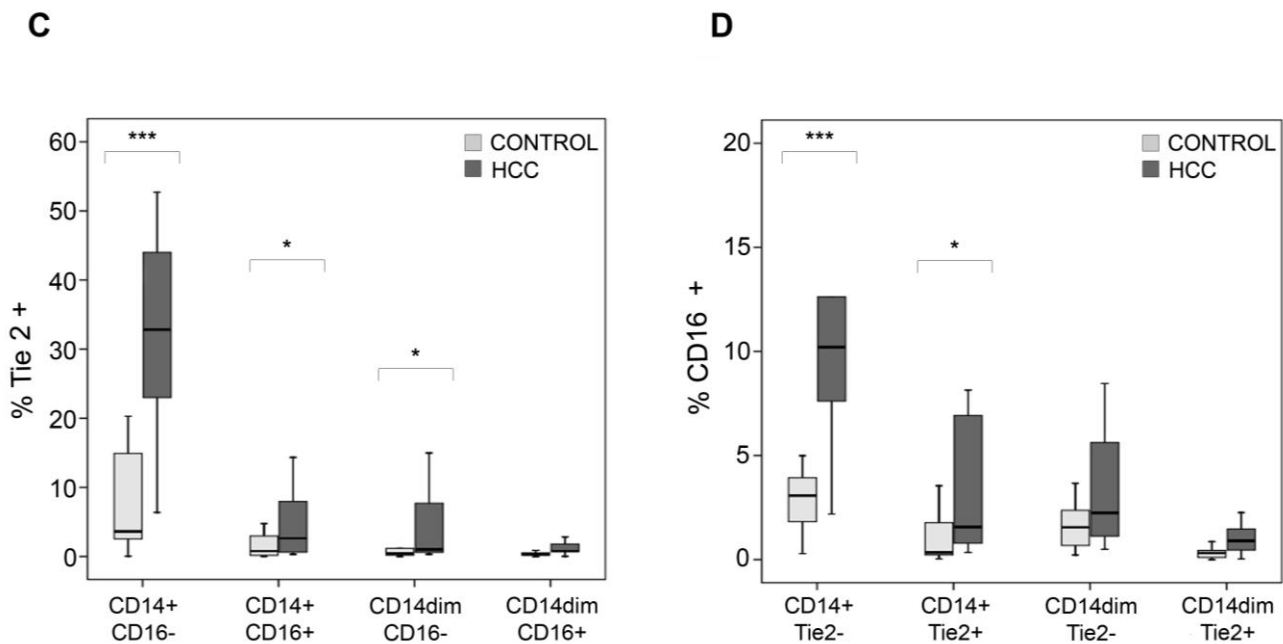


Figura 5. Caracterización de subpoblaciones de monocitos Tie2 y CD16 positivos en función de la expresión de CD14, CD16 y CD14, Tie2, respectivamente. Los histogramas representan el porcentaje de células Tie2 (A) y CD16 (B) positivas de las diferentes subpoblaciones de monocitos caracterizados para CD14/CD16 (A) y CD14/Tie2 (B) de un control y un paciente HCC representativos (histograma gris) con respecto al control de isotipo (líneas negras abiertas). Los diagramas de cajas C y D muestran la mediana de los porcentajes \pm 95% IC de los diferentes subconjuntos de monocitos periféricos de todos los controles y los pacientes con HCC incluidos en el estudio. Como se puede observar los pacientes con HCC muestran un notable incremento de monocitos periféricos Tie2 + y CD16+ en comparación con los controles, principalmente de los CD14+ simultáneamente negativos para el restante marcador analizado, CD16 o Tie2 (primera caja gris oscuro de gráficos C y D respectivamente) (* para $p < 0.05$ y *** para $p < 0.001$, U de Mann Whitney).

Este análisis permitió reafirmar los resultados obtenidos en el inmunofenotipado mediante marcaje simple y doble, confirmando el incremento de las poblaciones pro-inflamatorias y pro-angiogénicas en los pacientes con HCC. Además, nos ayudó a identificar que la población de monocitos pro-angiogénicos en pacientes con HCC estaba formada principalmente por aquellas células CD14+Tie2+CD16-, mientras que la población pro-inflamatoria CD16+ se constituía mayoritariamente por monocitos CD14+Tie2- ($p < 0.05$, ambos; primera caja gris oscuro de **figura 5C y D**, respectivamente).

1.5. Polarización monocítica y variables clínicas

La proporción de monocitos CD16+ en pacientes con HCC se asociaba directamente con el porcentaje de monocitos periféricos, especialmente la subpoblación de monocitos CD14+/CD16+ ($p = 0.001$), ya que no se encontró ninguna asociación con la subpoblación de CD14dim/CD16+ (**Figura 6A**). Por otra parte las poblaciones de monocitos pro-inflamatorios, principalmente los subgrupos Tie2-, se correlacionaban inversamente con la carga viral en los pacientes con HCC ($p = 0.006$, $p = 0.012$ y $p = 0.023$, **figura 6B**)

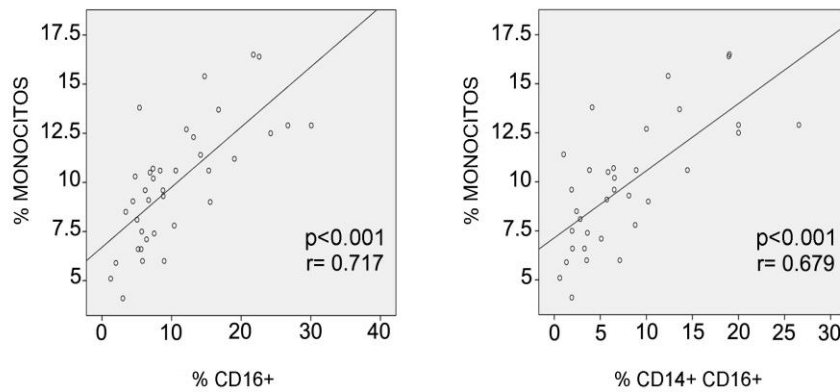
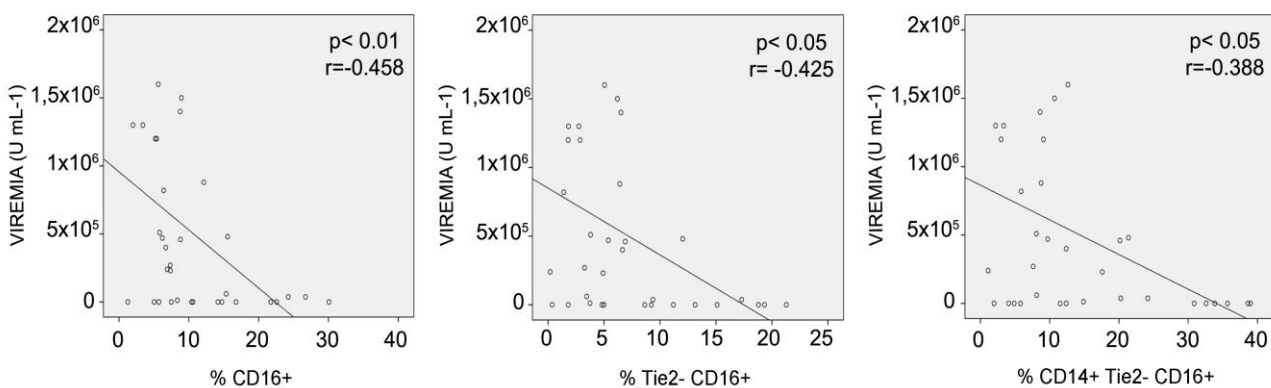
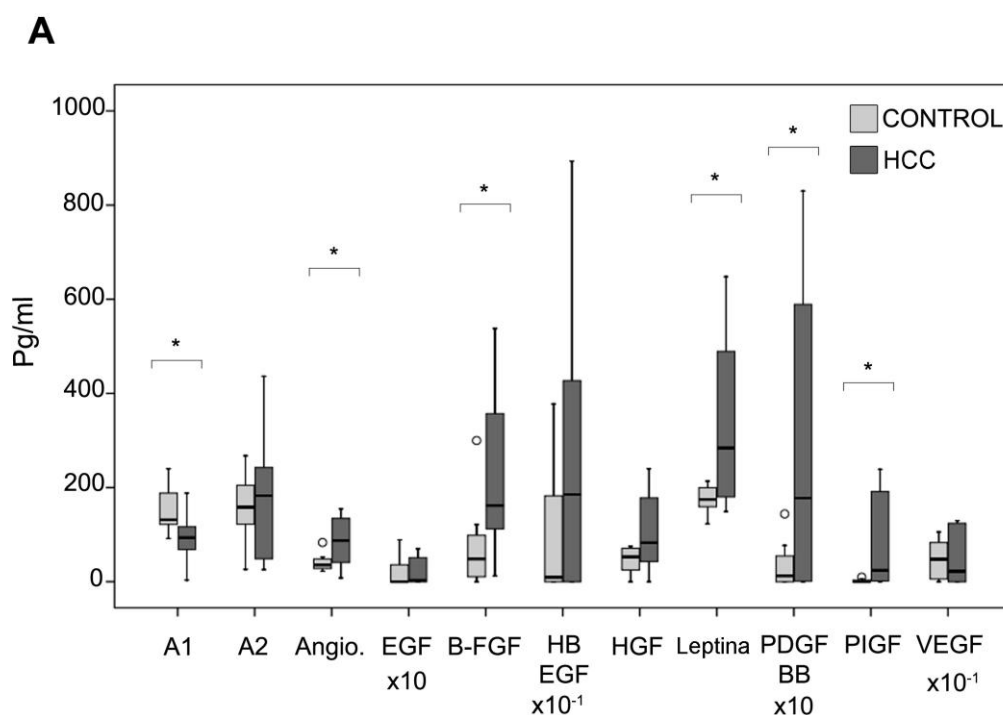
A**B**

Figura 6. La proporción de monocitos proinflamatorios se correlaciona con el porcentaje de monocitos totales y la viremia en los pacientes con HCC. Las gráficas muestran la relación directa entre la proporción de las subpoblaciones de monocitos CD16+ y el porcentaje total de monocitos, calculados mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Esta correlación se debe fundamentalmente a la aportación de la población de monocitos proinflamatorios CD14+CD16+ (A). Por otra parte, el porcentaje de monocitos pro-inflamatorios se correlaciona inversamente con la viremia (B). La significación estadística se representa mediante la Rho de Spearman (r), y la significación (p).

2. SECRECCIÓN DE FACTORES ANGIOGÉNICOS Y DE REMODELADO TISULAR POR LOS MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON HCC

Evaluamos los niveles de expresión de distintas moléculas relacionadas con angiogénesis y el remodelado tisular en los sobrenadantes de los monocitos aislados de pacientes y sujetos control, cultivados durante 24 horas. Se observó una evidente disminución de los niveles de Ang1 en las muestras de pacientes HCC ($p = 0.018$), mientras que otros factores, tales como angiogenina, B-FGF, leptina, PDGF-BB y PLGF, fueron significativamente más altos en los enfermos respecto a los controles (**Figura 7A**).

Los niveles de todos los factores de remodelado tisular analizados disminuyeron en los sobrenadantes de monocitos de pacientes con HCC con respecto a los controles, a excepción de MMP-1 y MMP-3. Las diferencias más notables se dieron en MMP-9 y TIMPs, aunque en ningún caso fueron estadísticamente significativas. (**Figura 7B**).



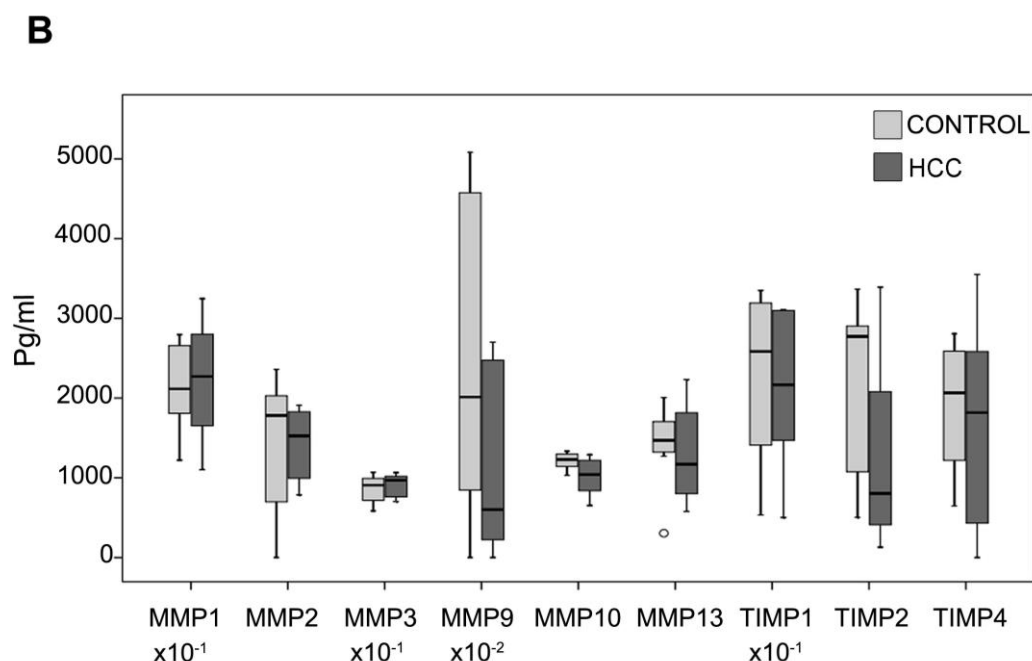


Figura 7. Expresión de factores angiogénicos y de remodelado tisular en monocitos aislados de sangre periférica de controles sanos y pacientes con HCC. Todos los factores angiogénicos, excepto Ang1, se encontraron aumentados en los sobrenadantes de monocitos de pacientes con HCC con respecto a los controles tras 24h de cultivo (A). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en cuanto a la expresión de los diferentes factores de remodelado tisular (B). La secreción de Ang1 y Ang2 se analizó mediante ELISA y el resto de los factores se cuantificó por cuadruplicado mediante una array de proteínas comercial. Las cajas representan la mediana y los percentiles 25 y 75 de la concentración en pg/mL +/- 95% IC. La significación estadística se analizó mediante el test de la U de Mann Witney, representada como (* $p < 0.05$). Las diferencias en el orden magnitud de los diferentes factores se representan con el correspondiente factor x10. A1: Angiopoyetina 1; A2: Angiopoyetina 2; Angio: Angiogenina.

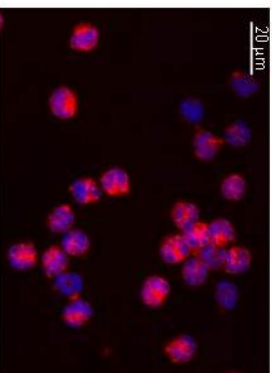
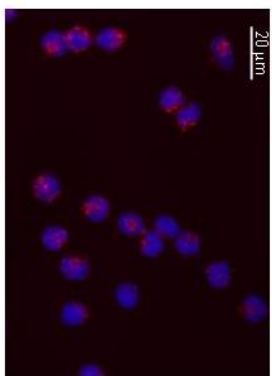
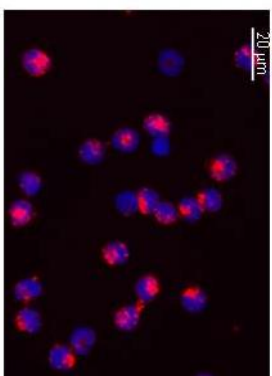
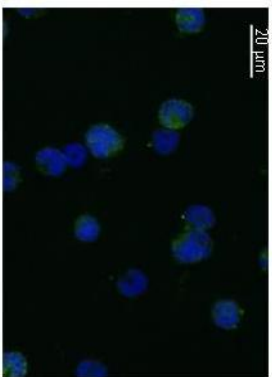
3. EXPRESIÓN CELULAR DE ANGIOPOYETINAS/TIE2 EN LOS MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Se realizó un marcaje intracelular inmunofluorescente para Ang1 y Ang2, y de superficie para el receptor Tie2. Las preparaciones mostraron una mayor proporción de monocitos capaces de expresar Tie2 en la sangre periférica de los pacientes con HCC en comparación con los controles sanos. Como se aprecia en la **figura 8A**, también se observó una tinción diferencial de las angiopoyetinas en los pacientes con HCC con respecto a los controles, encontrándose Ang1 ligeramente disminuida de en los monocitos de los pacientes con HCC mientras que la Ang2 resultaba aumentada. Las fotografías mostradas son representativas de 4 experimentos independientes en los que se analizaron al menos 5 células por campo, a lo largo de 5 campos en la preparación.

La **figura 8B** muestra la cuantificación de las imágenes corregida en función del marcaje residual del fondo de cada fluorocromo, apreciándose diferencias significativas en la expresión de Tie2, Ang1 y Ang2 entre pacientes con HCC y controles sanos ($p < 0.05$, calculada mediante la Prueba U de Mann Whitney).

A

Tie2



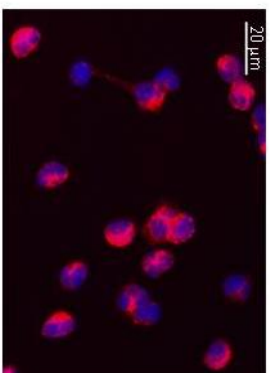
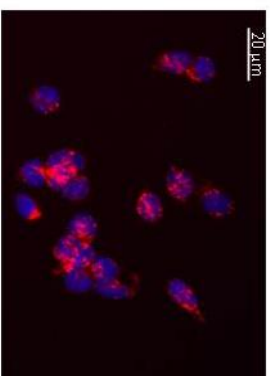
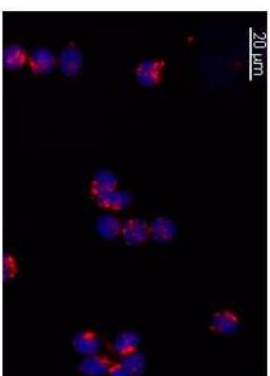
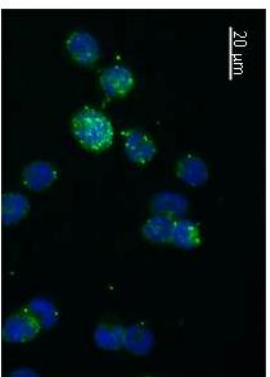
Angiopoietina1

Angiopoietina2

Tubulina

CON-RO

ICC



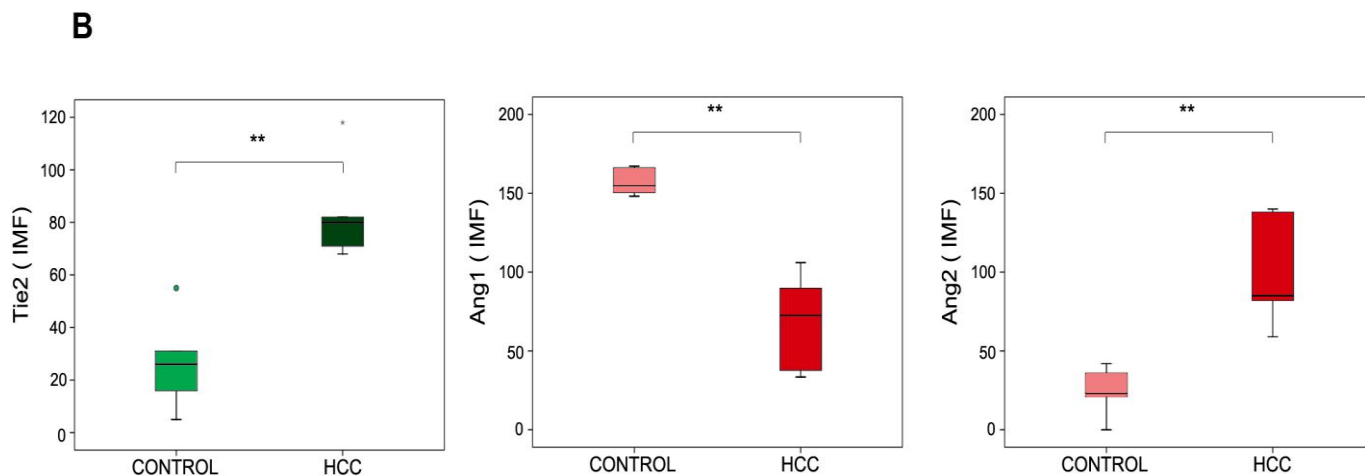


Figura 8. Detección de la expresión de Tie2, Ang1 y Ang2 en monocitos aislados de sangre periférica de pacientes con HCC y controles sanos. (A) Las inmunofluorescencias muestran la expresión de Tie2 en verde, y de Ang1 y Ang2 en rojo, en monocitos aislados de sangre periférica. Se utilizó un marcaje intracelular de tubulina como control de permeabilización. Los núcleos se marcaron con DAPI para facilitar la identificación de las células en el microscopio de epifluorescencia. Las imágenes se tomaron con el objetivo de 40x. **(B)** La cuantificación se realizó midiendo la intensidad media de fluorescencia (IMF), corregida en función del marcaje residual, en 5 campos diferentes a lo largo de la preparación. Los diagramas de cajas representan la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada uno de los fluorocromos analizados \pm 95% IC. La significación estadística se analizó mediante el test de la U de Mann Whitney, representada como ** ($p < 0.01$).

4. ENSAYOS DE INVASIÓN

Demostrada la producción diferencial de varios factores pro-angiogénicos y de remodelado tisular en los monocitos de sangre periférica de pacientes con HCC, se decidió comprobar si ésta se acompañaba de alguna alteración funcional en dichas células.

Con el fin de evaluar el comportamiento migratorio de estos monocitos, se realizaron una serie de experimentos de invasión celular en placas Transwell recubiertas con una matriz de colágeno.

Los monocitos periféricos estimulados con MCP-1, principal factor quimiotáctico de monocitos, mostraban un patente incremento de la actividad migratoria con respecto a las mismas células sin estimular, comportamiento que se daba tanto en el caso de pacientes ($***p = 0.001$, caja negra, **figura 9**), como en los controles ($*p = 0.014$, caja blanca, **figura 9**). Cuando los monocitos eran estimulados con angiopoyetina 1 recombinante (Ang1r) presentaban una mayor capacidad invasiva en todos los casos ($*p = 0.019$) siendo éste incremento más acusado en el caso de los pacientes con HCC ($***p = 0.001$). Por otra parte, las células condicionadas con Ang2 recombinante (Ang2r) mostraban un comportamiento más invasivo que las no estimuladas, aunque en menor medida que los monocitos activados con Ang1r; sin embargo, las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas en los monocitos aislados de pacientes ($***p = 0.001$). Estos efectos se atenuaron al bloquear Tie2 con un anticuerpo neutralizante específico, tanto en los pacientes HCC como en los controles ($\# p = 0.050$ y $## p = 0.002$, respectivamente); no obstante, en el caso de la estimulación con Ang2r, la neutralización con anti-Tie2 fue menos efectiva, mostrando sólo un bloqueo significativo en el caso de los pacientes con HCC ($## p = 0.010$).

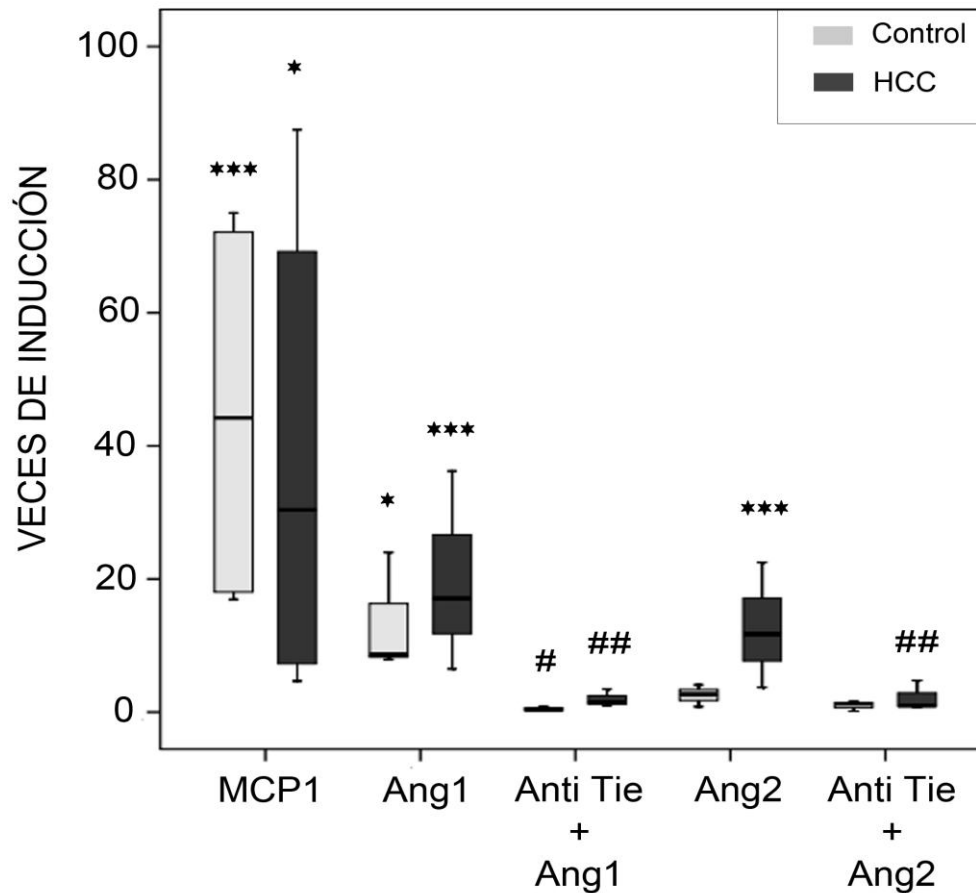


Figura 9. Ensayos de invasión con monocitos asilados de sangre periférica de pacientes con HCC y controles sanos. La gráfica muestra las veces de inducción de la tasa de invasión de las células estimuladas con MCP-1, Ang1, Anti Tie2+Ang1, Ang2 y Anti Tie2+Ang2 con respecto al medio RPMI suplementado con 0.2% de FBS. Las cajas expresan la mediana +/- el 95% IC. Significación estadística calculada mediante la prueba de la U de Mann Whitney: * muestran las diferencias en la tasa de migración de los distintos estímulos con respecto al medio RPMI al 0.2% de FBS (* $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$); # muestra las diferencias estadísticas entre Ang1+ Anti-Tie2 versus Ang1 y Ang2+ Anti-Tie2 versus Ang2 (# $p < 0.05$ y ## $p < 0.01$).

5. IDENTIFICACIÓN DE TEMs EN LOS INFILTRADOS HEPÁTICOS DE PACIENTES CON HCC

La presencia de monocitos Tie2 positivos en los infiltrados hepáticos de pacientes con HCC se realizó en cortes de biopsias hepáticas de 3 enfermos con HCC. Elegimos pacientes con estadios de fibrosis y grados de inflamación entre F2-F3 y G2-G3, repectivamente. La **figura 10** muestra la tinción específica con anti-CD14 (**A&E**), anti-CD31 (**B&F**) y anti-Tie2 (**C&G**), así como la imagen combinada de los tres marcajes en **D y H**. Las figuras A,B,C y D corresponden a una zona del parénquima hepático donde se apreciaban los sinusoides hepáticos marcados de forma específica con CD31, que en ocasiones aparecían asociados a células Tie2 positivas (**figura 10D**). Las tinciones demostraron también la existencia de monocitos capaces de expresar CD14 y Tie2 de manera simultánea en las zonas porta inflamadas de diferentes pacientes con HCC (**figura 10H**). Al realizar la cuantificación de la fluorescencia de los TEMs se pudo apreciar cómo estos monocitos poseían una tinción positiva tanto para el anticuerpo anti-CD14 acoplado a -APC, como para anti-Tie2 Alexafluor-568 (**Figura 11**).

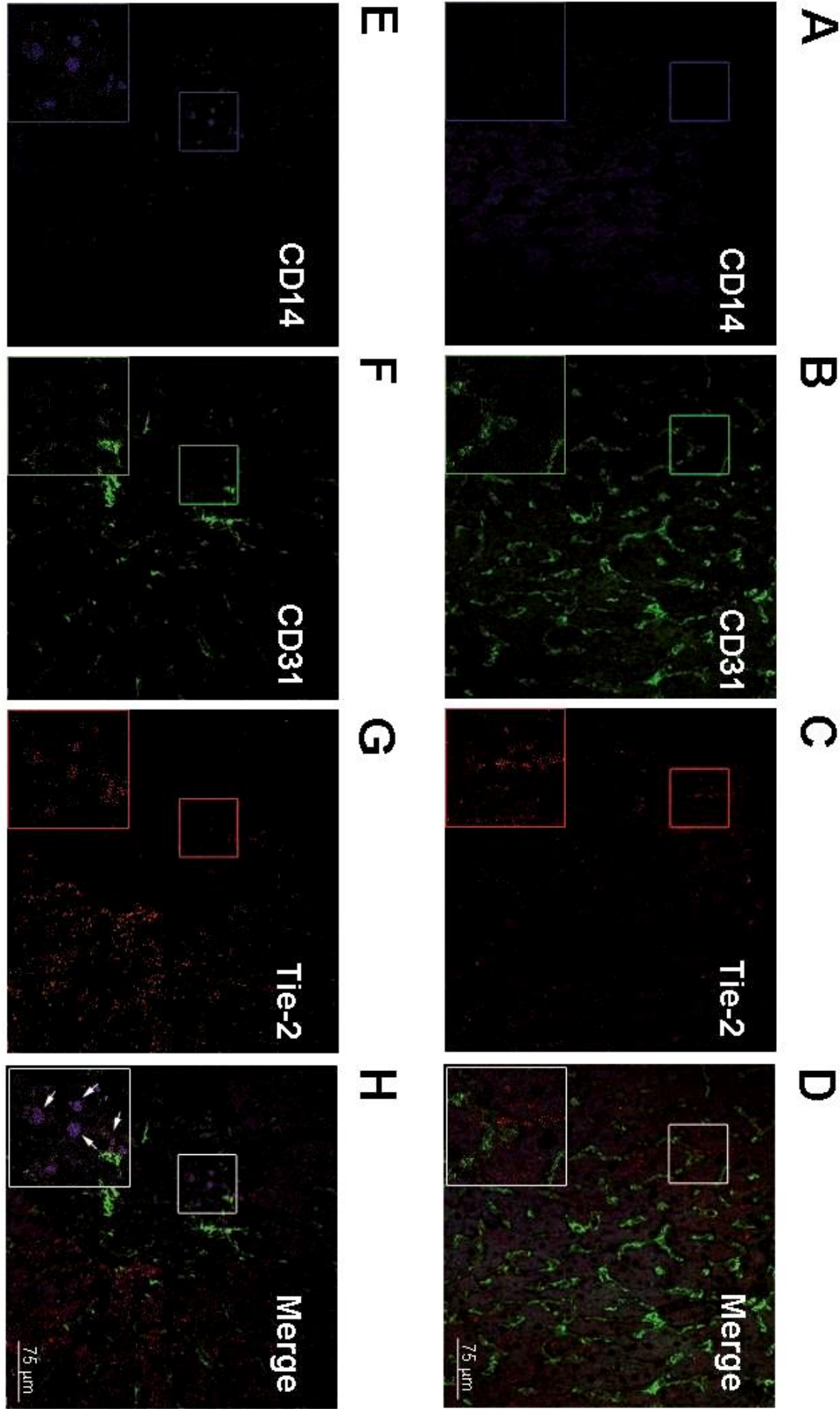


Figura 10. Identificación intrahepática de TEMs en tejidos de pacientes con HCC. El análisis confocal muestra la tinción simple en una misma sección de CD14-APC, CD31 AlexaFluor-568 y Tie2 AlexaFluor-568 (A-E, B-F y C-G) en diferentes biopsias de pacientes con HCC representativos. Las fotografías D y H muestran el marcaje combinado de los tres anticuerpos. La expresión intrahepática de Tie2 apareció frecuentemente asociada a las células CD31 positivas de los sinusoides hepáticos (A-D). En los infiltrados hepáticos se pudieron identificar los TEMs CD14+Tie+ (flechas, E-H). Las imágenes se tomaron con el aumento de 400x y los detalles de la parte inferior son ampliaciones 800x. Se muestra un paciente representativo de 3.

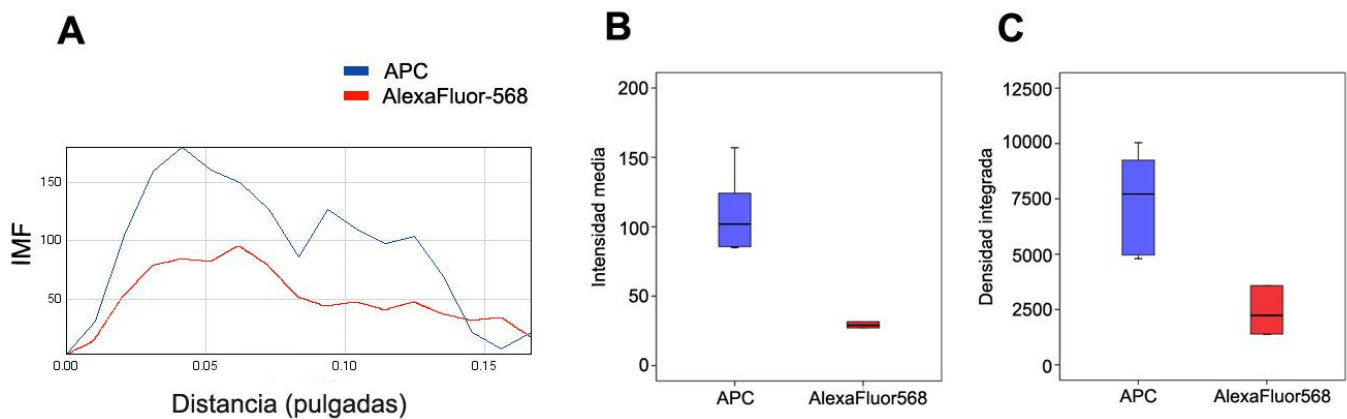


Figura 11. Análisis confocal de TEMs. (A) El histograma ilustra la IMF del marcaje con CD14 y Tie2 a lo largo del eje de un TEM representativo. Los diagramas de cajas muestran la mediana +/- IC del 95% de la intensidad media de fluorescencia (B) y de la densidad de fluorescencia integrada (C) de los distintos TEMs identificados, a partir del análisis tres pacientes diferentes con HCC. Línea/caja azul: antiCD14-APC. Línea/caja roja: anti-Tie2 AlexaFluor-568.

6. EVALUACIÓN DE MONOCITOS Y CÉLULAS DERIVADAS DE MONOCITOS (CD-Mo) EN PACIENTES CON HEPATITIS CRÓNICA C.

6.1 Diferencias fenotípicas en la diferenciación y maduración de CD-Mo en pacientes con HCC y controles

Tras observar la significativa polarización fenotípica de los monocitos periféricos en los pacientes con HCC, y la alteración funcional que poseían, decidimos comprobar si las CD-Mo derivadas de estos monocitos eran portadoras de defectos en la expresión de los principales marcadores de diferenciación y maduración o/y en el sistema Ang/Tie2. En primer lugar se caracterizó la población de monocitos periféricos de 8 pacientes con HCC y de 9 controles sanos analizando la expresión de los diferentes marcadores de diferenciación y maduración: CD11b, CD80, CD86, MHC-II y CD83.

6.1.1 Transición monocito - MDMs

Con el fin de evaluar la posible alteración desencadenada por la HCC en el proceso de diferenciación de monocitos a MDMs se realizó el marcaje del receptor CD11b, el cual aparece de manera específica en la membrana de los macrófagos.

En la **Figura 12** se aprecia cómo el porcentaje de células que expresan el receptor CD11b es mayor en los macrófagos diferenciados a partir de monocitos de individuos control que en aquellos derivados de monocitos de pacientes afectados de HCC (**p = 0.007).

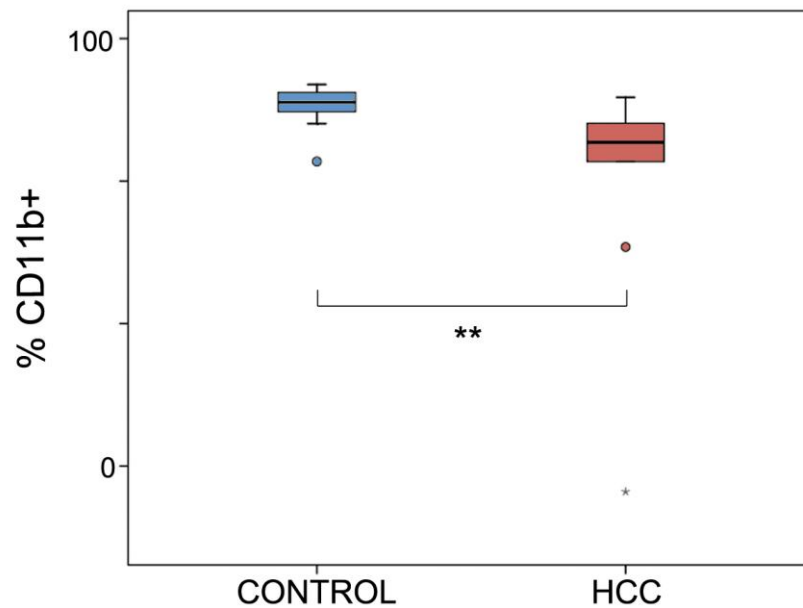


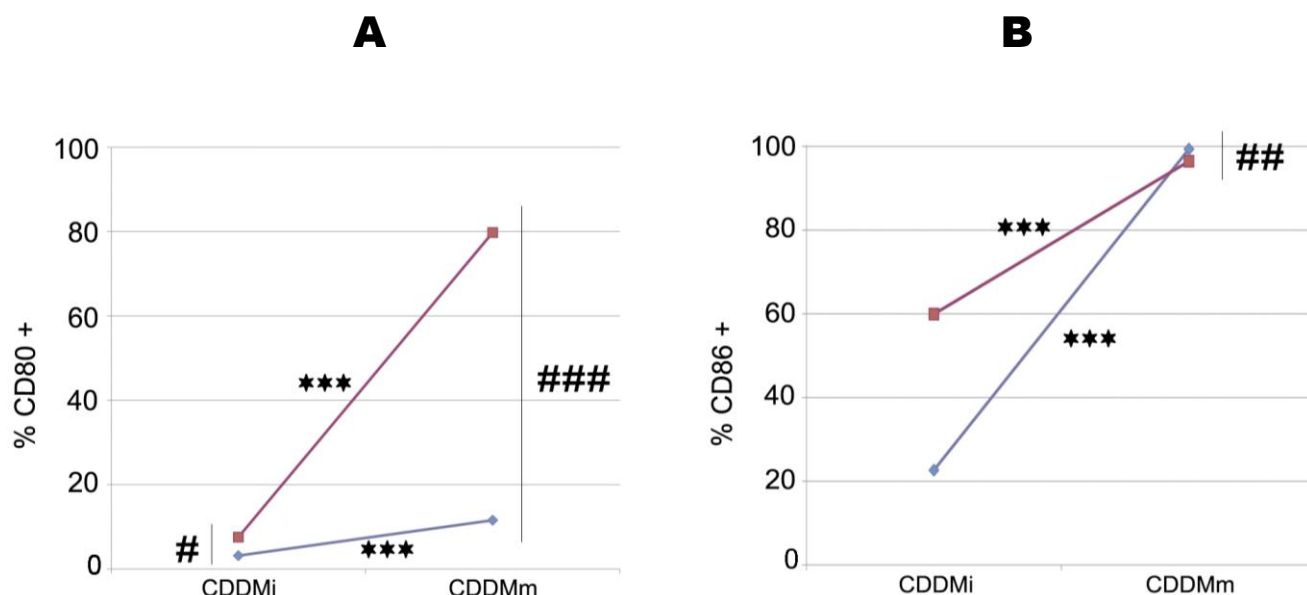
Figura 12. Proporción de células que expresan CD11b tras la diferenciación de monocitos a MDMs. El gráfico muestra la proporción de MDMs que expresan CD11b en las células procedentes de individuos sanos en comparación con aquellas procedentes de pacientes. Las cajas representan la mediana y los percentiles 25 y 75 del porcentaje de células positivas +/- 95% IC; ** $p < 0.01$ por prueba U de Mann-Whitney.

6.1.2 Diferenciación y maduración de CDDMs

Para evaluar el efecto de la infección crónica por el VHC sobre la maduración de las células dendríticas, las células CDDMs de pacientes y controles se incubaron durante 24 horas con LPS (0.1 mg/ml). A continuación se evaluó la expresión de los siguientes marcadores de superficie: MHC de clase II o molécula HLA-DR; CD80/B7-1 y CD86/B7-2 moléculas co-estimuladoras necesarias para activación de células T y CD83, un marcador específico de maduración.

La proporción de CDDMs que expresaban los distintos marcadores fenotípicos fue superior en los pacientes con HCC respecto a los controles, especialmente en el caso de CD80 (# $p = 0.016$, **figura 13A**) y CD83 (## $p = 0.005$, **figura 13D**).

Durante la maduración, se observó un incremento porcentual significativo de células que expresaban todos los marcadores seleccionados (*** $p = 0.001$, todas, **figura 13 A, B, C&D**), con la excepción de MHC-II en los pacientes con HCC. Por otra parte, las CDDMs maduras de pacientes mostraron una proporción de células CD86+ y MHC-II+ significativamente menor que las CDDMs control (## $p = 0.005$ y # $p = 0.021$, respectivamente; **figura 13B y 13C**) mientras que el porcentaje de células CD80+ fue significativamente superior en las CDDMs de pacientes comparadas con las de los controles (### $p = 0.001$, **figura 13A**).



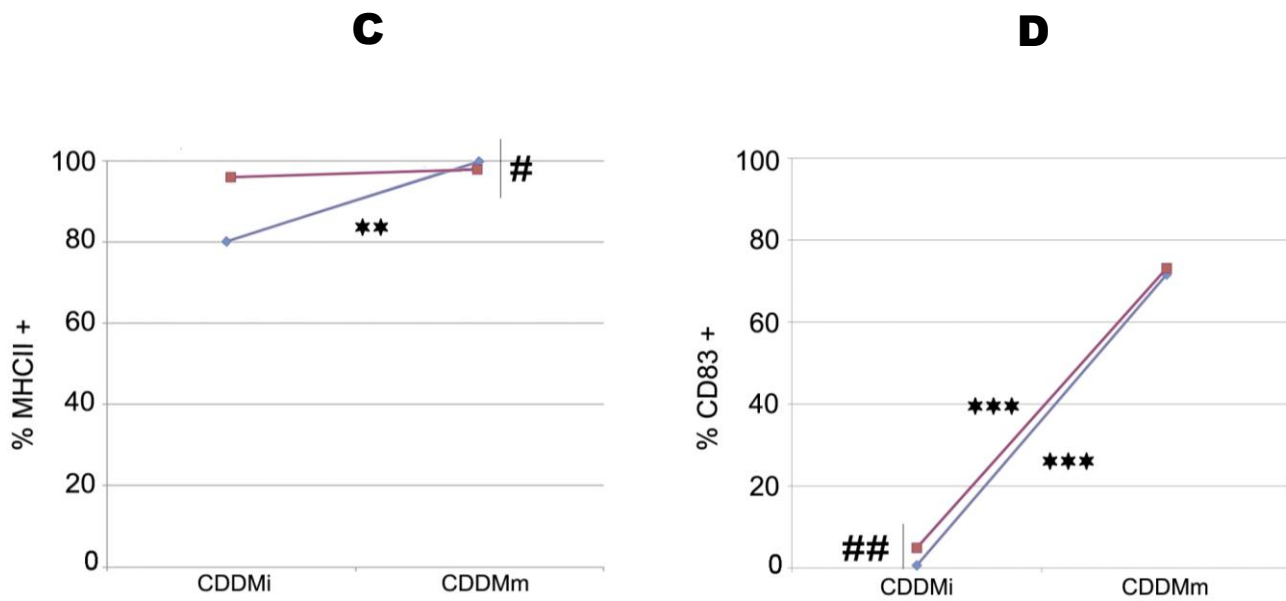


Figura 13. Expresión de CD80, CD86, MHC-II y CD83 en células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica de controles y pacientes con HCC. Los gráficos muestran la mediana del porcentaje de CDDMs y CDDMs maduras con expresión de CD80, CD86, MHC-II y CD83 en los sujetos control y en los pacientes con HCC. Las CDDM inmaduras de pacientes con HCC mostraron una mayor expresión de CD80 y CD83 respecto a los controles ($\# p < 0.05$ y $\#\# p < 0.001$; A y D, respectivamente). Tras la maduración, las CDDMs maduras de pacientes mostraron un notable incremento de CD80 ($\#\#\# p < 0.001$; A), mientras que CD86 y MHC clase II experimentaron un descenso significativo, llegando a niveles por debajo de los controles ($\#\# p < 0.01$ y $\# p < 0.05$; B y C, respectivamente). Tras la maduración, las células de los controles y pacientes mostraron un incremento significativo en todos los marcadores analizados ($***p < 0.001$ en A, B&D), excepto para MHC clase II de pacientes con HCC ($** p < 0.01$, C). La significación estadística se calculó mediante la prueba de la U de Mann Whitney y aparece representada como $\#$ para HCC vs. Control, y como $*$ para la significación estadística entre monocitos y CD-Mo.

6.2 Análisis fenotípico de CD-Mo de sangre periférica

Tras comprobar la notable alteración en la expresión de los diferentes marcadores de diferenciación y maduración en las CD-Mo de pacientes con HCC, se analizó la expresión de CD14 y el receptor Tie2 por marcaje simple mediante citometría de flujo. Nuevamente, encontramos un incremento significativo de las poblaciones de monocitos que expresaban Tie2 (# $p=0.016$) en los pacientes con HCC.

Para examinar si estas las modificaciones en la expresión de Tie2 se perpetuaban en el proceso de diferenciación/maduración, se realizó el análisis del porcentaje de células Tie2+ en MDMs, CDDMs y CDDMs maduras generadas “*in vitro*” a partir de dichos monocitos (**Figura 14**) (Tabla 3). Se detectó un descenso gradual y significativo de células Tie2 positivas en el proceso de diferenciación tanto de monocitos a CDDMs (** $p = 0.001$, línea roja, **figura 14A**) como a MDMs (** $p = 0.001$, **figura 14B**) en los pacientes con HCC; mientras que en el caso de los controles fue menos acusado y sólo se observó en la diferenciación de monocitos a CDDMs (* $p = 0.019$) (Línea azul, **figura 14A**). De manera interesante, tras la maduración, las CDDMs de los controles mostraban mayores niveles de Tie2 que las CDDMs de los pacientes, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

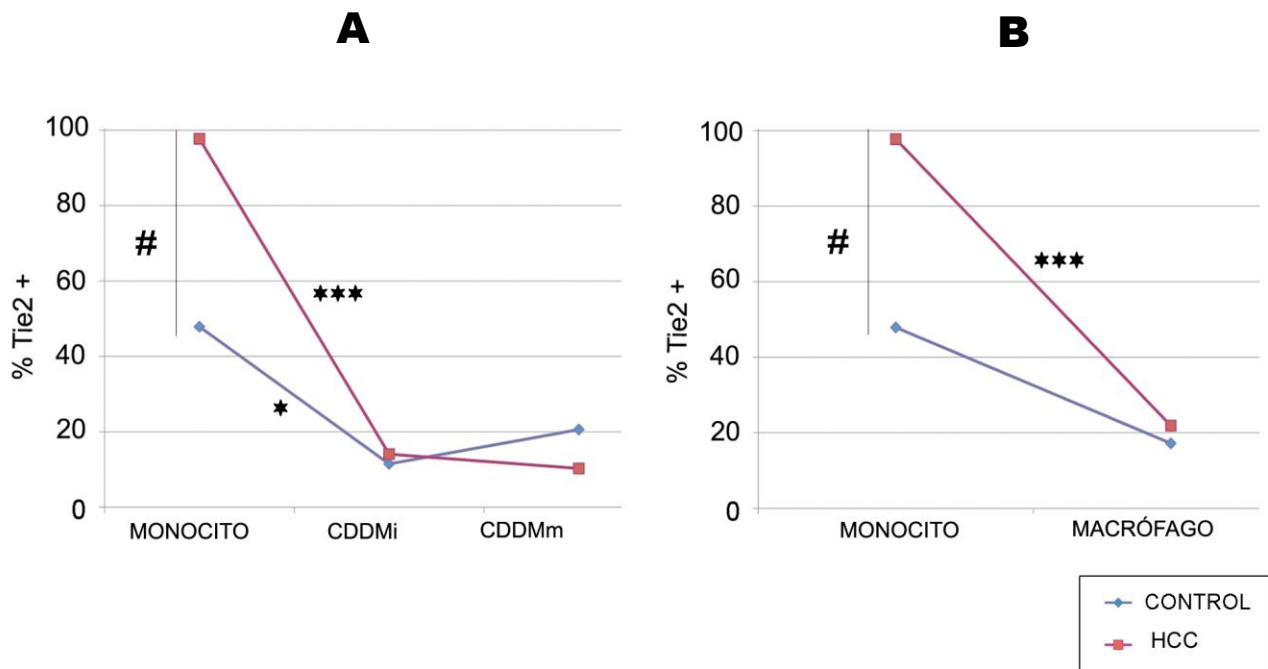


Figura 14. Expresión de Tie2 en monocitos aislados de sangre periférica y células derivadas. Los gráficos muestran la variación en la proporción de monocitos Tie2+ en la sangre periférica de pacientes con HCC (línea roja) y controles sanos (línea azul), así como en CD-Mo durante su diferenciación y maduración “in vitro” hacia CDDMs y CDDMs maduras(A) y MDMs (B). Los puntos representan la mediana del porcentaje de células Tie2 positivas. La significación estadística se analizó mediante el test de la U de Mann Whitney, representada como # $p < 0.05$, * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$, donde las “#” muestran las diferencias entre células de pacientes con HCC y controles sanos, y los “*” muestran las diferencias significativas entre los distintos tipos de células derivadas durante el proceso de diferenciación/maduración. CDDMi, Células dendríticas Inmaduras; CDDMm, Células dendríticas maduras.

6.3 Niveles de expresión de angiopoyetinas durante la diferenciación y maduración.

La expresión y liberación de Ang1 y Ang2 fue evaluada mediante ensayos de ELISA.

6.3.1 Expresión de angiopoyetina 1

De forma similar a los resultados previos, se observó una disminución significativa de la expresión de Ang1 en las muestras de los monocitos de pacientes con HCC en comparación con los sujetos control ($## p = 0.006$) (**Figura 15A y B**). El análisis de los sobrenadantes de CD-Mo reflejó una expresión disminuida de Ang1 en todos los grupos procedentes de pacientes con HCC, que fue estadísticamente significativa en el caso de CDDMs maduras ($\# p = 0.027$) en relación con las células originadas a partir de los monocitos procedentes de los individuos control (Tabla-3) (**Figura 15A**). Durante el estudio de la síntesis de esta molécula a lo largo de los procesos diferenciación/maduración se comprobó que en el caso de los controles se producía un progresivo, aunque ligero, incremento de los niveles de Ang1 conforme los monocitos se diferenciaban hacia CDDMs y MDMs (**Figura 15A y 15B**, respectivamente), aunque sin llegar en ningún caso a ser significativo. En el caso de los pacientes con HCC los niveles de expresión de Ang1 se mantuvieron constantes tanto en la diferenciación de monocitos a CDDMs y MDMs (**Figura 15A y B**, respectivamente), como en la maduración de CDDMs a CDDMs maduras.

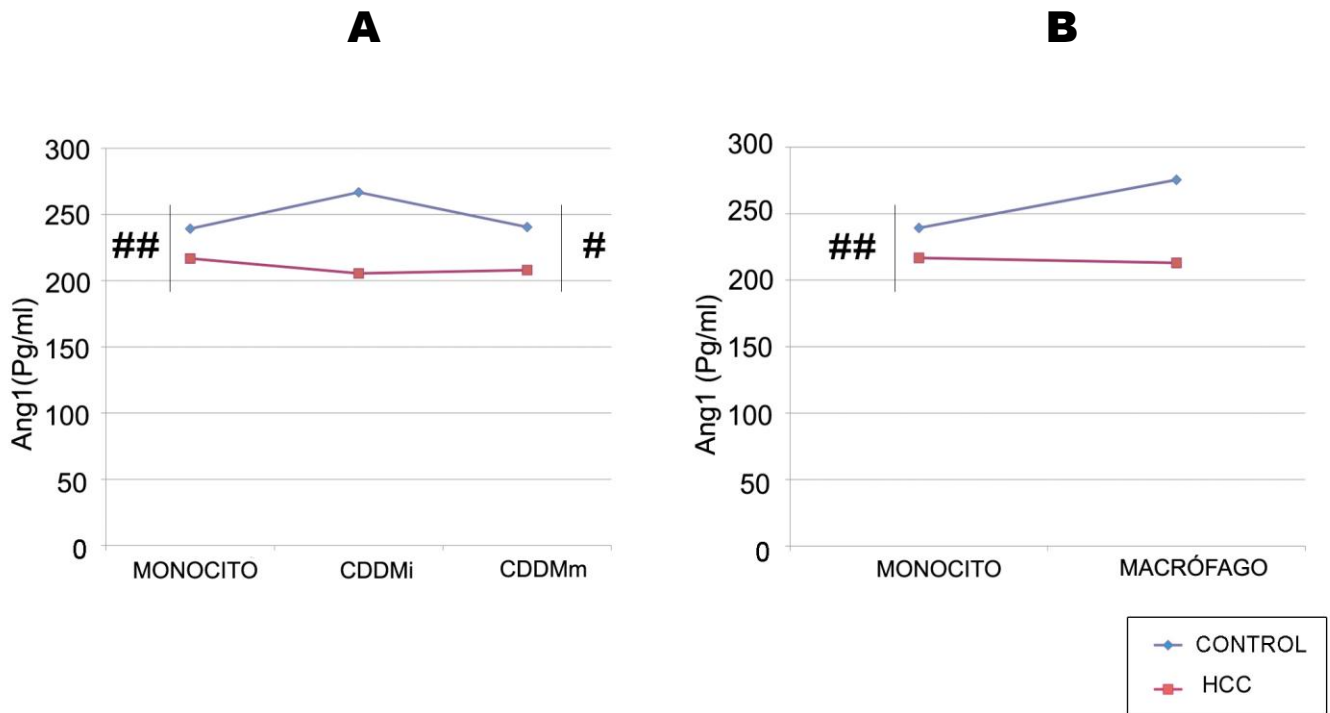


Figura 15. Expresión de Ang1 en monocitos aislados de sangre periférica y CD-Mo de pacientes con HCC y controles sanos. Los gráficos muestran la mediana de la concentración de Ang1 en los sobrenadantes de monocitos y CD-Mo de pacientes con HCC y sujetos control durante los procesos de diferenciación y maduración. Los niveles de Ang1 se encontraban aumentados en los monocitos y CDDM maduras de controles en relación con los pacientes con HCC (## $p < 0.01$ y # $p < 0.05$, U de Mann Whitney). La significación estadística aparece representada como # en HCC vs. Control. CDDMi, Células dendríticas Inmaduras; CDDMm, Células dendríticas maduras.

6.3.2 Expresión de angiopoyetina 2

En relación a la liberación de Ang2 en el sobrenadante de CDDMs, CDDMs maduras y MDMs, se observó que los niveles de esta molécula eran significativamente mayores en las muestras de pacientes con HCC en comparación con las de los controles (# $p=0.048$ y ## $p=0.01$, **figura 16A**; y # $p=0.015$, **figura 16B**) (Tabla 3). Cabe resaltar que, mientras la cantidad de Ang2 en el sobrenadante de las distintas CD-Mo de pacientes con HCC se mantuvo prácticamente estable durante la diferenciación/maduración, las CD-Mo de los controles experimentaron una disminución significativa de la expresión de Ang2 durante la transición de los monocitos a CDDMs y MDMs (** $p=0.002$, ambos, **figura 16A y 16B**, respectivamente).

La **Figura 16** muestra el patrón de expresión de Ang2 en el proceso de diferenciación de los monocitos al resto de CD-Mo.

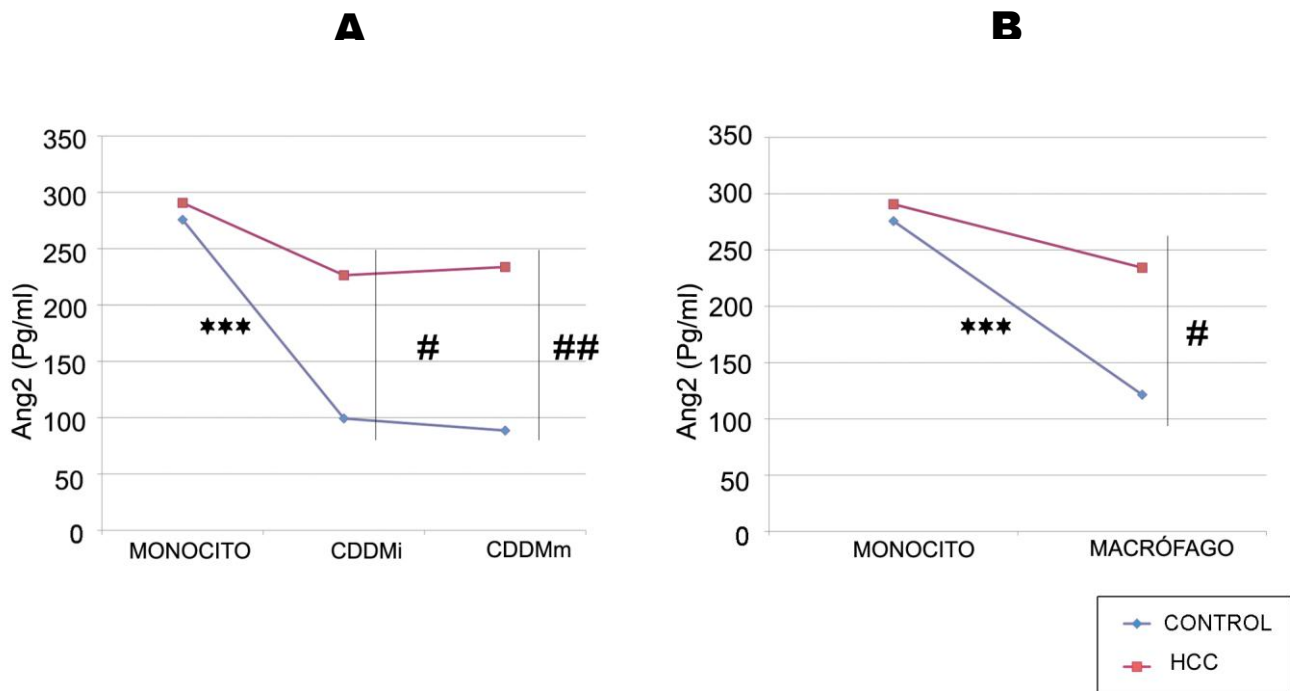


Figura 16. Expresión de Ang2 durante la diferenciación/maduración de monocitos aislados de sangre periférica y CD-Mo. Los puntos representan la mediana de la concentración de Ang2 en el sobrenadante de monocitos y CD-Mo de controles y pacientes con HCC. Se observa un patente descenso en la expresión de ésta molécula en la diferenciación de las células control ($***p < 0.001$, ambos), y frente a un nivel sostenido durante la diferenciación de las células de los pacientes con HCC. Las concentraciones de Ang2 en pacientes con HCC fueron mayores en los sobrenadantes de CDDMs, CDDMs maduras (A, # $p < 0.05$ y ## $p < 0.01$, respectivamente) y MDMs (B, # $p < 0.05$) en comparación con los controles. Significación estadística calculada mediante Test de U de Mann Whitney. CDDMi, Células dendríticas Inmaduras; CDDMm, Células dendríticas maduras.

6.3.3 Relación angiopoietina 2/ angiopoietina 1

El análisis del cociente Ang2/Ang1 en los diferentes tipos celulares mostró que en los pacientes con HCC la fracción Ang2/Ang1 fue significativamente mayor en CDDMs maduras y MDMs (# $p = 0.014$ y # $p = 0.016$, respectivamente) con respecto a los sujetos de control (**Figura 17A y 17B**, respectivamente). Durante la diferenciación de las CD-Mo se encontró que, mientras en controles el cociente Ang2/Ang1 disminuía de forma significativa entre monocitos y CDDMs (* $p = 0.037$) (**Figura 17A**) y entre monocitos y MDMs (* $p = 0.02$) (**Figura 17B**), en los pacientes se mantenía constante.

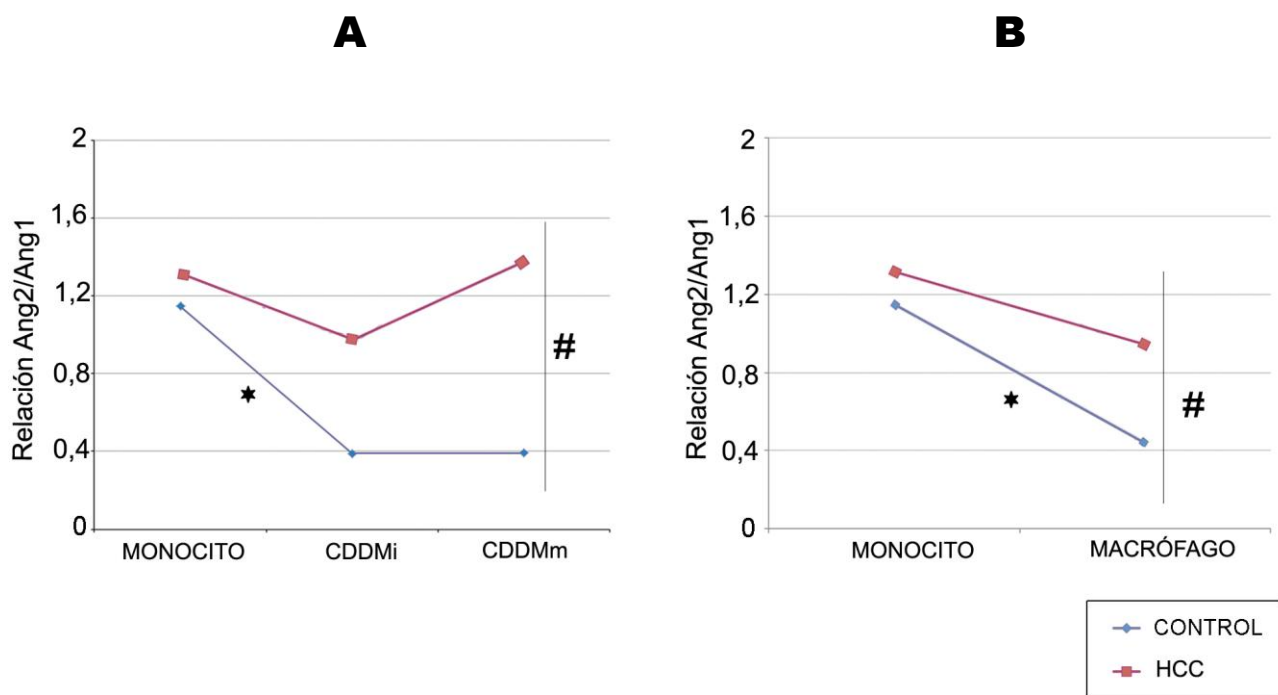


Figura 17. Relación Ang2/Ang1 en monocitos de sangre periférica y CD-Mo. El gráfico muestra la fracción de Ang2/Ang1 en los sobrenadantes de monocitos y CD-Mo en pacientes con HCC y controles (HCC vs. Control: # $p < 0.05$; monocitos vs. CD-Mo: * $p < 0.05$, U de Mann Whitney).

Tabla 3. Porcentaje de células con expresión positiva de Tie2, Ang1, Ang2, CD80, CD83, CD86 y MHC-II en monocitos y CD-Mo, expresados como mediana +/- IC al 95%.

	Monocito		MDM	
	Control	HCC	Control	HCC
Tie2	48 (25-84)	97 (86-98)	17(7-62)	22 (10-45)
Ang1	240(207-328)	210(190-234)	278(165-458)	213(158-310)
Ang2	276(207-298)	275(227-342)	121(102-145)	234(144-314)
Proporción Ang2/Ang1	1,1(0,8-1,3)	1,3(1,1-1,5)	0,4(0,3-0,5)	0,9(0,3-1,7)

	CDDMi		CDDMm	
	Control	HCC	Control	HCC
Tie2	11(2-40)	14(7-18)	21(7-45)	10(4-23)
Ang1	267(135-495)	205(154-290)	241(180-381)	208(184-229)
Ang2	99(46-170)	227(124-338)	89(41-146)	233(140-320)
Proporción Ang2/Ang1	0,4(0,1-0,9)	0,9(0,2-2)	0,4(0,2-0,6)	1,4(0,6-1,9)
CD80	3,2 (2,6-5)	7,6(3-24)	11,6(8,6-15,3)	79,8(69,3-91,9)
CD83	0,7(0,1-2,3)	4,9(2,6-6,4)	71,6(51,1-79,2)	73,1(46,4-87,2)
CD86	19,6(11-53,4)	67(39,8-81,5)	99,3(98,3-99,7)	96,9(89,8-99,1)
MHC II	93(58,1-97,8)	97,7(90,7-99,7)	97,7(89,6-99,9)	98,3(93,7-99,7)

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha puesto de manifiesto el incremento del porcentaje de monocitos periféricos en la sangre de los pacientes con HCC, caracterizado mayoritariamente por el enriquecimiento de las subpoblaciones con marcado perfil proinflamatorio (CD16+) y proangiogénico (Tie2+). Estas subpoblaciones desempeñan funciones específicas enfocadas a la resolución de la infección vírica y a la reparación del daño tisular. Los monocitos CD16+ favorecen la activación de células T y producen citocinas proinflamatorias con el fin de activar la respuesta inmune específica. Por su parte, los monocitos Tie2, TEMs, son reclutados desde el torrente sanguíneo para mediar la reparación y el remodelado tisular. De forma interesante, los monocitos aislados de pacientes con HCC presentaban modificaciones fenotípicas y funcionales caracterizadas por la expresión diferencial de múltiples factores involucrados en la proliferación, diferenciación y migración celular, así como por la alteración de su comportamiento migratorio. De este modo, la incesante activación de estos subtipos celulares, mediadores de los procesos inflamatorios, angiogénicos y fibrogénicos, puede agravar el daño hepático ocasionado por la persistencia de la infección.

1. Los pacientes con HCC presentan niveles elevados de monocitos proinflamatorios y proangiogénicos

De acuerdo a la incesante demanda del tejido hepático dañado de células inmunes capaces de resolver la infección, encontramos un notable incremento del porcentaje de monocitos totales en la sangre de los pacientes con HCC. Las células de origen mieloide son importantes elementos de la inflamación hepática ya que, además de activar la respuesta adaptativa, son capaces de liberar citocinas inflamatorias que incluyen TNF-

α , IL-1 e IL-6 [123]. Nuestros resultados indican que el incremento del porcentaje de monocitos periféricos en pacientes con HCC se relaciona con el fracaso de la respuesta al tratamiento antiviral, lo que concuerda con los estudios previos que describen la asociación entre el aumento de los monocitos en pacientes con hepatopatía crónica y la progresión de la HCC [140].

Un análisis más detallado de las poblaciones monocíticas periféricas mediante multifuorescencia reveló que el incremento del porcentaje de monocitos totales en la sangre de los pacientes con HCC estaba caracterizado por un aumento sustancial de poblaciones de monocitos proinflamatorios (CD16+) y proangiogénicos (Tie+). De la misma forma, el análisis mostraba que el aumento de las poblaciones CD16+ y Tie2+ en pacientes con HCC era independiente de la expresión del otro marcador (Tie2 o CD16 respectivamente).

2. Monocitos CD16+ en los pacientes con HCC

El incremento periférico y el reclutamiento de monocitos durante procesos patológicos como infecciones y otras enfermedades inflamatorias hepáticas ha sido ampliamente descrito [140, 141]. En particular, el incremento de la población de monocitos CD14+CD16+ en la sangre de pacientes con HCC observado en nuestro estudio, coincide con los hallazgos de varios trabajos en los que también se describe un notable aumento de esta subpoblación de monocitos en la sangre periférica de pacientes con enfermedad de Crohn, septicemia, hepatitis autoinmune y cirrosis hepática de origen vírico [113, 115, 142, 143]. Este subtipo de monocitos puede actuar como precursor de la población de macrófagos infiltrados en el hígado, contribuyendo a la inflamación del tejido mediante la liberación de grandes cantidades de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IFN- γ e IL-6 y quimiocinas como MIP1- α MIP1- β (proteínas inflamatorias de

macrófagos) tras su diferenciación [140]. Además, se ha comprobado su capacidad para activar de forma directa las CEHs. Estos datos indican que estos monocitos CD16+ pueden tener un papel fundamental en la patogénesis de la HCC, perpetuando los procesos inflamatorios crónicos en el hígado y activando la secreción de múltiples quimiocinas por parte de las CEHs, que promueven el continuo reclutamiento de monocitos a los tejidos lesionados [144]. Recientemente se ha demostrado la contribución de la población de monocitos CD16+ en la progresión de la fibrosis hepática en estadios avanzados ($F > 3$ en la escala METAVIR) [140]. Sin embargo nuestros resultados no mostraron dicha relación quizás por el amplio espectro de nuestros pacientes, cuyos estadios variaban desde F1 a F4.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, observamos que en los pacientes con HCC este incremento de monocitos CD16+ (CD14+CD16+) se relacionaba de forma directa con el porcentaje total de monocitos. De forma interesante también observamos una correlación inversa de los monocitos CD16+ con la viremia, que se debía particularmente a la contribución del subgrupo CD16+ Tie-, de manera que la población de monocitos CD16+ podría desempeñar un papel destacado en el control de la infección. Como se ha descrito previamente, los monocitos proinflamatorios CD16+ intervienen en la inflamación hepática actuando: como células presentadoras de antígeno, fagocitando, y produciendo citocinas proinflamatorias [123]. Por tanto, este subgrupo de monocitos podría estar implicado en el establecimiento de una respuesta inmune efectiva, capaz de promover la eliminación del virus mediante la activación de células T específicas.

3. Monocitos Tie2 o TEMs y su relación con la respuesta al tratamiento antiviral combinado.

En contraposición a la población de monocitos proinflamatorios, la proporción de TEMs se relacionaba de manera inversa con la respuesta al tratamiento antiviral, de forma que el número de monocitos Tie⁺ era significativamente mayor en pacientes no respondedores en comparación con los respondedores. Además, los pacientes “*naïve*” también mostraban niveles incrementados de TEMs comparados con los respondedores.

Estudios recientes han descrito que la población de monocitos CD14⁺/Tie2⁺ es capaz de promover el remodelado vascular y la neoangiogénesis asociada a tumores y se ha sugerido que dicha subpoblación podría ser la principal precursora de los TEMs de los tejidos tumorales [118]. El estudio de los TEMs podría representar un nuevo factor pronóstico de la respuesta al tratamiento de la HCC por lo que, de forma similar a lo que se ha descrito para el cáncer [145, 146], la caracterización funcional de los TEMs podría representar un nuevo objetivo para futuras terapias moleculares en las enfermedades inflamatorias crónicas además de las de tipo tumoral. Estos monocitos/macrófagos constituyen un subgrupo de células genéticamente estables menos susceptibles a desarrollar resistencia a los medicamentos, de manera que los nuevos fármacos dirigidos a inhibir determinadas funciones de estas células podrían suponer un avance importante para lograr una terapia anticancerígena más efectiva [146].

El subgrupo de monocitos Tie2⁺ CD16⁺ también se vio discretamente incrementado en la sangre de los pacientes con HCC. Esta subpoblación, al igual los monocitos CD14⁺CD16⁺, puede actuar como precursora de los macrófagos de los infiltrados

tisulares, contribuyendo a la eliminación del virus y a la reparación de los tejidos dañados gracias a sus propiedades fagocíticas y angiogénicas [114].

En contra, la fracción de monocitos Tie⁺ CD16⁻ mostró una asociación con el fracaso de la respuesta al tratamiento antiviral. Esta subpoblación podría verse incrementada tras el daño del tejido hepático, que demandaría el reclutamiento de células con capacidad reparadora y de remodelado tisular [147]. Sin embargo, sería la naturaleza inmunosupresora de estas células [148] y su incapacidad para activar una respuesta inmune adecuada, lo que podría contrarrestar el efecto de la terapia antiviral.

El daño tisular provocado por la infección por VHC promueve la fibrosis y la acumulación de proteínas de ME que impiden la correcta difusión de oxígeno y nutrientes hacia los hepatocitos. Los fenómenos de hipoxia derivados provocan la inducción de factores angiogénicos, entre los que se encuentran la Ang2 y el VEGF, con el fin de favorecer estos intercambios. Como ha sido previamente descrito por nuestro grupo en la HCC [149] y por otros autores en diferentes hepatopatías inflamatorias [100, 150, 151], la falta de respuesta al tratamiento antiviral favorece la perpetuación del daño tisular y la secreción continua de Ang2, ligando de Tie2, lo que podría promover el reclutamiento de estos subtipos de monocitos y la persistencia de los fenómenos de neoangiogénesis [152].

En línea con estos hallazgos, se ha propuesto que la expresión de Tie2 en los precursores mieloides puede mediar su quimiotaxis desde la médula ósea, favoreciendo la acumulación periférica de TEMs y su reclutamiento hacia los focos inflamatorios y áreas tumorales con expresión de Ang2, donde pueden prolongar el efecto nocivo derivado de una angiogénesis patológica persistente [145, 146, 150]. Este hecho pone de manifiesto la importancia de esta subpoblación de monocitos en el equilibrio entre el daño y la reparación tisular

4. Los monocitos de sangre periférica de pacientes con HCC presentan una expresión diferencial de factores angiogénicos y de remodelado tisular

El incremento de las subpoblaciones pro-angiogénicas y pro-inflamatorias en pacientes con HCC podría traducirse en una alteración en la síntesis de citocinas, factores de crecimiento y metaloproteasas que favorecieran una remodelación tisular anómala a nivel hepático, facilitando la persistencia de la fibrosis y los fenómenos angiogénicos asociados a la HCC. La polarización de las subpoblaciones monocíticas hacia aquellas con potencial pro-angiogénico y pro-inflamatorio se tradujo en un aumento en la expresión de factores angiogénicos como angiogenina, B-FGF, HGF, leptina, PDGF-BB, y PLGF en los monocitos de pacientes con HCC en comparación con los controles.

La **angiogenina** es un polipéptido con una potente actividad vasculogénica que puede actuar tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Resultados previos han descrito el aumento de los niveles de esta proteína en el suero de pacientes con carcinoma hepatocelular, relacionado con el desarrollo de un fenotipo de tumor hipervascularizado [153]; por tanto, el incremento de esta molécula en pacientes con HCC podría ser un factor indicativo de la propensión de estos pacientes al desarrollo de hepatocarcinoma.

En condiciones patológicas, el factor **PLGF** se une de manera específica al receptor 1 de VEGF (VEGFR-1) y neuropilina-1, incrementando el efecto del VEGF y consecuentemente la neoangiogénesis [154, 155]. Además, **PLGF** estimula la supervivencia de CEs y monocitos [155-157] y juega un papel fundamental en los procesos inflamatorios al favorecer el reclutamiento de CEs, monocitos, células madre hematopoéticas y “*natural killers*”, además de estimular la migración y quimiotaxis de células inflamatorias.

Por su parte el incremento en la expresión de **B-FGF** y **HGF** en los monocitos de pacientes con HCC favorece la proliferación de las CEs, actuando directamente sobre la fase de formación de los neovasos en el proceso de angiogénesis. Por otro lado, el hecho de detectar una sobreproducción de **PDGF** en estos monocitos periféricos concuerda con los datos que ya describían un marcado incremento en la expresión de **PDGF** en macrófagos y leucocitos infiltrados en el transcurso de las hepatitis víricas y cirrosis [158, 159]. **PDGF** actúa reclutando pericitos y células mesenquimales hacia los vasos en formación, promoviendo su proliferación, estabilización y mantenimiento. Los resultados obtenidos están en la línea de las conclusiones de otros trabajos en los que se describe que el incremento de esta molécula, y de sus receptores específicos, a nivel sinusoidal favorece la estabilización de los nuevos vasos [160, 161] durante los fenómenos angiogénicos asociados las hepatopatías crónicas de etiología vírica. En el hígado **PDGF** funciona como un potente agente mitogénico y quimiotáctico para las CEHs, principales productoras de elementos de matriz extracelular y células clave en el inicio y desarrollo de la fibrosis [162]. El papel pro-inflamatorio y pro-fibrogénico de éstas células ha sido ampliamente estudiado; sin embargo, experimentos recientes han demostrado cómo **PDGF** promueve un fenotipo angiogénico de CEHs [163], que podría contribuir a la formación de los neovasos y al recubrimiento de los sinusoides o “capilarización sinusoidal”. El resultado sería el empeoramiento del intercambio de factores y oxígeno en el hígado y la generación de un ambiente hipóxico, lo que reforzaría los fenómenos de angiogénesis patológica.

De acuerdo con lo descrito anteriormente también se observó en los monocitos de pacientes con HCC un importante aumento de la **leptina**, hormona que puede actuar como mediador pro-fibrogénico al activar las CEHs. Este hecho concuerda con los datos obtenidos por varios estudios en los que se describe cómo la leptina actúa estimulando

la liberación de VEGF, Ang1 y MCP-1 por parte de las CEHs [164]. Estos datos ponen de manifiesto la estrecha relación entre el efecto proangiogénico de estos factores y la activación de la diferenciación de las CEHs hacia un fenotipo con alta actividad angiogénica y fibrogénica, que puede desempeñar un papel fundamental en la regeneración hepática, al mediar los fenómenos de fibrosis y angiogénesis asociados al daño hepatocelular en la HCC.

Por otra parte, encontramos un marcado descenso de la expresión de **Ang1** y un ligero incremento de **Ang2** en los sobrenadantes de los monocitos de pacientes con HCC en comparación con los controles. En estudios previos se ha descrito la asociación existente entre el incremento de **Ang2** en el suero de pacientes con HCC con el estadio de fibrosis y el fracaso en la respuesta al tratamiento antiviral con Peg-IFN y RIB [165]. Como se ha descrito previamente, la **Ang1** promueve la estabilización de los neovasos, modulando las uniones intercelulares [98] y facilitando la interacción entre las CE y las células murales, mientras que la Ang2 favorece la desestabilización, la apoptosis de CE y la regresión o ramificación final de los vasos en función de la presencia de VEGF. Por tanto, la alteración en los niveles de expresión periféricos de estas moléculas podría provocar el desarrollo de una red vascular desorganizada, permeable y laxa, permitiendo la infiltración de células inmunes, factores, etc. y probablemente la diseminación de células tumorales.

Las **MMPs**, así como sus inhibidores específicos los **TIMPs**, también tienen un papel fundamental en los fenómenos angiogénicos y de remodelado durante la infección crónica viral. Esto se refleja en los experimentos realizados en modelos animales que demuestran cómo estas moléculas contribuyen a la migración y proliferación de las CE activadas, regulando la degradación de matriz extracelular y su remodelado (efectos que tienen un relevante papel en la fibrogénesis e invasión tumoral) [166, 167]. La

inducción de MMPs en el hígado se debe mayoritariamente a factores proinflamatorios y profibrogénicos, aunque el virus también puede actuar directamente en su expresión: la infección de los hepatocitos con la proteína X del VHB induce una regulación positiva de MMP-2, lo que resulta en incremento de la capacidad invasiva de los hepatocitos tanto *in vivo* como “*in vitro*” [168]. En nuestro estudio encontramos diferencias en el patrón de expresión de estas moléculas entre los monocitos de los pacientes y controles, de forma que estos últimos presentaban niveles superiores de la mayor parte de las MMPs analizados y de los TIMPs, pero en ningún caso resultaron ser estadísticamente significativos.

En conclusión, la alteración del patrón de expresión de los diferentes factores analizados en los monocitos de los pacientes con HCC puede tener importantes repercusiones en el control de la quiescencia vascular, dando lugar a la formación de una red vascular intrahepática capilarizada, inmadura y permeable, que favorecería la extravasación de factores y células inmunes, e incluso la diseminación de las células tumorales. Además, la mayoría de estas moléculas están relacionadas con la remodelación de tejidos y su inducción se asocia con la aparición y progresión de carcinoma hepatocelular [169, 170], de forma que la monitorización de los niveles de estas moléculas podría ser útil a la hora de evaluar la eficacia del tratamiento y el progreso de la enfermedad.

5. Los monocitos de pacientes con HCC poseen una mayor capacidad invasiva

Una vez observado el patente incremento en la expresión de los factores proangiogénicos en los monocitos de pacientes con HCC, decidimos valorar la capacidad de migración de estas células, sometiéndolas al estímulo de diferentes moléculas quimiotácticas. Dado que se ha descrito la ausencia de CCR2 (receptor de MCP-1) en los TEMs, el reclutamiento de estas células a los tejidos dañados y tumores

debe responder a mediadores no inflamatorios, por lo que decidimos utilizar como atrayentes a sus ligandos naturales Ang1 y Ang2. Los ensayos de invasión demostraron que existe un aumento en la capacidad invasiva de los monocitos de pacientes estimulados con Ang2, en comparación con los monocitos de los individuos control, tratados o no con Ang1 y/o Ang2. De igual manera, estos monocitos de pacientes también presentan una mayor respuesta invasiva al añadir Ang1 en el medio, lo que indica que poseen una mayor sensibilidad a los estímulos proangiogénicos que los monocitos procedentes de los individuos control, que por el contrario presentan una mayor capacidad invasiva en presencia del principal agente quimiotáctico de monocitos, MCP-1. Además el empleo de anticuerpo neutralizante frente a Tie2 fue capaz de bloquear la inducción de la capacidad migratoria de los monocitos, lo que indica la relevancia del sistema Ang/Tie2 en la actividad invasiva de dichas células.

Estos datos sugieren que los monocitos de pacientes con HCC, particularmente los TEMs, responden al estímulo quimiotáctico tisular de Ang1/Ang2 y que su receptor, Tie2, estaría involucrado en dicho proceso. Como se ha descrito previamente, los TEMs circulantes no expresan CD62L, una molécula de adhesión de la familia de las selectinas que facilita el rolling de los leucocitos inflamatorios a lo largo del endotelio vascular, ni CCR2, el receptor de MCP-1 (CCL2), una quimiocina implicada en el reclutamiento de los monocitos inflamatorios a los tumores a áreas inflamadas. El hecho de que los TEMs carezcan de CCR2 y CD62L, excluiría su ubicación en los tejidos inflamados. Sin embargo, se ha observado cómo las células mieloides pro-angiogénicas portadoras de un gen inducible de VEGF son reclutadas en ausencia de estímulos inflamatorios [171], por lo tanto, es posible que el reclutamiento de los TEMs a los tumores y tejidos dañados esté controlado por un circuito de mediadores no inflamatorios. De esta manera, los TEMs serían reclutados a zonas de lesión avasculares, atraídos por un

gradiente dependiente de Ang2, y una vez allí podrían promover los fenómenos angiogénicos. Estos datos coinciden con los estudios en los que demuestran que existe un incremento de Ang2 en las áreas de tumoración hepáticas [103], en las que la hipoxia, produce además una rápida liberación de la Ang2 almacenada en los “*Weibel-Palade Bodies*” de las CEs [104, 172], fenómenos que en conjunto promoverían la aparición de un gradiente de Ang2 que favorecería la afluencia de células sensibles a este estímulo angiogénico.

6. Presencia de TEMs en los infiltrados hepáticos

El análisis intrahepático por inmunofluorescencia reveló la existencia de monocitos Tie+ en el hígado de pacientes con HCC con alto grado de actividad histológica (grado y estadio). Estas células se ubicaban de manera preferencial en los espacios porta inflamados, frecuentemente, asociadas al endotelio vascular. Estos hallazgos concuerdan con los estudios que describen a los TEMs como mediadores paracrinós capaces de estimular la angiogénesis, en lugar de ser incorporados activamente a la neovasculatura, en contraposición a los progenitores endoteliales derivados de la médula, capaces de promover la neovascularización tumoral a través de la liberación de factores proangiogénicos [130]. Por otra parte, también se observó la expresión de Tie2 en el parénquima hepático, estrechamente relacionada con la presencia de células CD31 positivas, lo que podría indicar áreas de fibrogénesis activa según se ha descrito previamente [173]. En estas zonas Tie2 se expresa de forma específica en las células alfa-SMA positivas localizadas en los bordes de los tabiques fibrosos en desarrollo, mientras que en los tabiques completos la expresión de Tie2 se limita exclusivamente a las células endoteliales [109, 174].

Las lesiones hepáticas en la HCC se caracterizan por la presencia de hipoxia y una marcada actividad angiogénica, fenómenos íntimamente relacionados con el incremento de Tie2 en los TEMs [150] y con la sobreexpresión de Ang2 a nivel tisular. La inducción intrahepática de Ang2 podría promover la migración de los TEMs circulantes reclutándolos desde el torrente sanguíneo, mediante la activación del receptor Tie2, lo que explicaría su ubicación en las proximidades de los vasos. De forma interesante, al igual que se ha descrito en los TEMs, varios estudios han referido la inducción del receptor Tie2 en las CEs de ciertas áreas de tumoración hepática [175, 176]. Estos datos en conjunto sugieren la existencia de un circuito de retroalimentación positivo que podría reforzar el reclutamiento de los TEMs hacia los tejidos lesionados.

7. Alteración de la diferenciación y maduración de las células derivadas de monocitos de pacientes con HCC

Como se ha descrito previamente, los monocitos contribuyen al ambiente inflamatorio hepático al enriquecer las poblaciones de macrófagos y células dendríticas del tejido tras su migración, diferenciación y maduración. Estas células forman parte del sistema inmune innato y desempeñan un importante papel durante la infección viral al promover la respuesta inmune de las células T específicas.

El establecimiento de la infección crónica por el VHC está relacionado con la ineffectividad de éstas células para mediar una apropiada activación de las células T [177]. En este sentido, se ha demostrado que determinadas proteínas del VHC, como core y NS3, modulan la respuesta inmune suprimiendo la función tanto de células T citotóxicas como de DCs [79, 178].

De acuerdo con la habilidad del VHC para deteriorar la función presentadora de las DCs, hemos observado importantes alteraciones en la expresión de los marcadores de

diferenciación en las CDDMs generadas “*in vitro*” a partir de los monocitos de pacientes con HCC. Encontramos un importante incremento de la proporción de CDDMs inmaduras que expresaban CD80, CD86, MHC-II y CD83 en las células procedentes de monocitos de pacientes con HCC en comparación con los controles. A este respecto el VHC, al igual que otros virus, podría promover una sobreexpresión de estas moléculas coestimuladoras [179-182], interfiriendo con la capacidad de las CDs de responder a los estímulos para la maduración. El incremento basal en la expresión de estos marcadores haría a estas células menos susceptibles a la respuesta de maduración, dando lugar a un tipo de CDs parcialmente inmaduras, disminuyendo su capacidad para activar a las células T antivirales e impidiendo la generación de una respuesta inmune efectiva.

Tras estimular las CDDMs con LPS, el aumento del número de células CD86+ y MHC-II+ fue inferior respecto a los controles, mientras que el incremento de células CD80+ fue mucho más pronunciado en los pacientes con HCC tras la maduración. De forma interesante, las variaciones en el porcentaje de células, se acompañaron de las mismas variaciones en cuanto a la intensidad de fluorescencia (IMF) en todos los marcadores analizados, excepto en el caso del marcador CD80 en los pacientes, donde la IMF se invertía (datos no mostrados). En este caso la IMF llegó a alcanzar valores superiores en los controles que en los pacientes, lo que indica que, aunque una mayor parte de CDDMs en pacientes expresa CD80, los niveles de expresión son mucho menores que en los controles. Estos datos coinciden con los publicados por Auffermann y colaboradores, que comprobaron cómo las CDDMs de pacientes con HCC sin respuesta previa al tratamiento antiviral expresaban bajos niveles de moléculas de superficie tales como CD83, CD86 y CD54 tras el tratamiento con TNF- α [183], lo que indica que estas células no responden adecuadamente al estímulo y, por lo tanto, alcanzan una

maduración parcial, disminuyendo su capacidad como célula presentadora de antígeno e impidiendo una adecuada respuesta inmune.

Existe una gran controversia en los datos publicados acerca de la funcionalidad alterada de las CDDMs en los pacientes con HCC; no obstante, de forma similar a las observaciones de otros autores, nuestros resultados sugieren la existencia de modificaciones en las propiedades aloestimulatorias y en la maduración de las CDDMs de pacientes con HCC en comparación con controles sanos.

8. Desequilibrio en la expresión del sistema Ang/Tie2 en la diferenciación de monocitos a macrófagos y células dendríticas

Al estudiar la expresión del sistema Ang/Tie2 en el proceso de diferenciación de los monocitos periféricos hacia los distintos tipos de CD-Mo, observamos un descenso gradual de células Tie2⁺ durante la diferenciación “*in vitro*” de monocitos a macrófagos y a células dendríticas tanto en los pacientes con HCC como en los controles sanos. De forma interesante, encontramos un desequilibrio en la expresión de las angiopoyetinas durante la diferenciación de los monocitos en los pacientes con HCC en relación a los controles. Mientras que la expresión de Ang1 en la diferenciación de los monocitos de controles se mantenía prácticamente estable a lo largo de todo el proceso, los niveles de Ang2 experimentaban una importante disminución en el paso de monocito a macrófago y célula dendrítica. Además, los niveles de Ang1 eran claramente inferiores en los pacientes con HCC. Este fenómeno se acompañaba de una expresión aumentada y sostenida de Ang2 durante la diferenciación de los monocitos de los pacientes con HCC.

En resumen, nuestros hallazgos indican que en condiciones fisiológicas, tras la diferenciación de los monocitos a MDM y CDDM, estas células expresarían niveles

irrelevantes de Tie2 y Ang2, conservando una expresión estable de Ang1 y favoreciendo el mantenimiento de la quiescencia vascular y, por tanto, minimizando la infiltración celular, y la inflamación.

En oposición, las CD-Mo de pacientes con HCC, mantendrían elevadas concentraciones de Ang2 y bajas de Ang1 al diferenciarse. La unión de Ang2 a Tie2 promueve la permeabilización y desestabilización de la red vascular, y es un factor que se expresa de forma predominante en situaciones patológicas y tejidos tumorales. Como se ha descrito en párrafos anteriores, además actúa como un potente quimioatrayente de los monocitos Tie2+, reclutándolos desde el torrente sanguíneo hacia la lesión tisular [118, 150]. Por tanto, la diferenciación de éstos monocitos Tie2+ en las áreas inflamadas, podría dar lugar a una población de macrófagos y células dendríticas con propiedades netamente inmunosupresoras y una exacerbada expresión de Ang2, contribuyendo así a la desestabilización de la vasculatura [184], y a la extravasación de células con reducida capacidad inmunológica, eminentemente proangiogénicas, favoreciendo así la persistencia de la inflamación y la angiogénesis patológica (Figura 18).

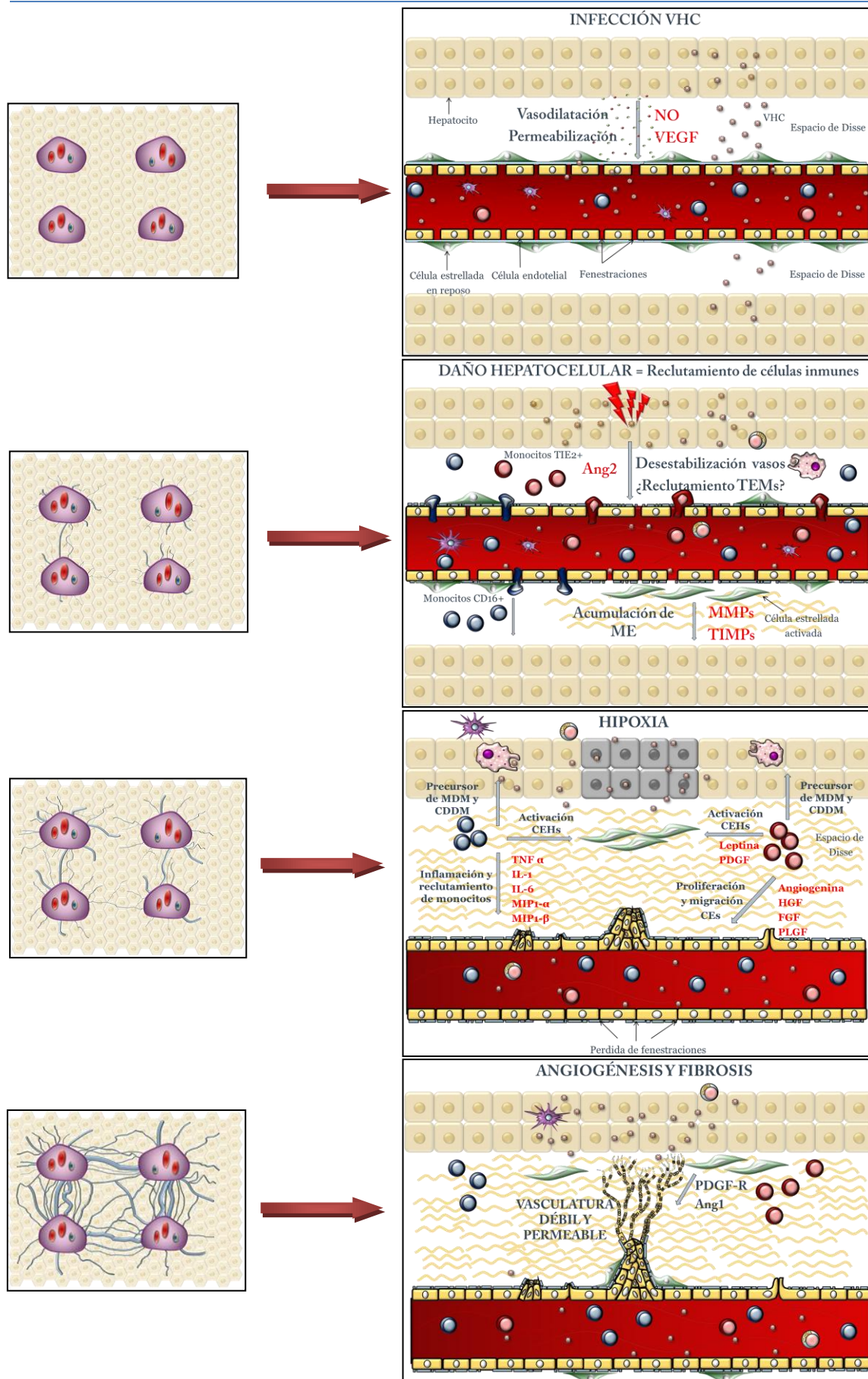


Figura 18. Papel patológico de los monocitos en la Hepatitis crónica C

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los pacientes con HCC presentan una clara modificación en la distribución de las distintas subpoblaciones de monocitos periféricos, con una marcada polarización hacia los subtipos proangiogénicos y proinflamatorios (TEMs y CD16+, principalmente).
2. Este cambio está vinculado a un notable desequilibrio en la expresión de diversos factores proangiogénicos en los sobrenadantes de los monocitos de pacientes con HCC.
3. El aumento de TEMs en los pacientes con HCC, en particular la subpoblación de Tie2+/CD16-, está directamente relacionado con la ausencia de respuesta al tratamiento antiviral convencional de Peg-IFN más RIB.
4. El incremento de las subpoblaciones monocíticas que expresan CD16 en los pacientes con HCC se correlaciona inversamente con los niveles de viremia.
5. Los monocitos de pacientes con HCC poseen una mayor capacidad invasiva tras ser estimulados con Ang1 y Ang2 en comparación con los monocitos aislados de sujetos control, que responden más favorablemente al estímulo quimiotáctico mediado por CCR2.
6. La alteración de la diferenciación y maduración de los macrófagos y células dendríticas derivadas de los monocitos de pacientes con HCC va acompañada de un desequilibrio en la expresión del sistema Angiopoyetinas/Tie2.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Wasley, A. and M.J. Alter, *Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends*. Semin Liver Dis, 2000. **20**(1): p. 1-16.
2. Shepard, C.W., L. Finelli, and M.J. Alter, *Global epidemiology of hepatitis C virus infection*. Lancet Infect Dis, 2005. **5**(9): p. 558-67.
3. Poynard, T., et al., *Viral hepatitis C*. Lancet, 2003. **362**(9401): p. 2095-100.
4. Guidotti, L.G. and F.V. Chisari, *Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis*. Annu Rev Pathol, 2006. **1**: p. 23-61.
5. McLean, K. and R.J. Buckanovich, *Myeloid cells functioning in tumor vascularization as a novel therapeutic target*. Transl Res, 2008. **151**(2): p. 59-67.
6. Gordon, S., *Do macrophage innate immune receptors enhance atherogenesis?* Dev Cell, 2003. **5**(5): p. 666-8.
7. Anghelina, M., et al., *Monocytes/macrophages cooperate with progenitor cells during neovascularization and tissue repair: conversion of cell columns into fibrovascular bundles*. Am J Pathol, 2006. **168**(2): p. 529-41.
8. Anghelina, M., et al., *Monocytes and macrophages form branched cell columns in matrigel: implications for a role in neovascularization*. Stem Cells Dev, 2004. **13**(6): p. 665-76.
9. Ziegler-Heitbrock, H.W., *Definition of human blood monocytes*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(5): p. 603-6.
10. Tacke, F. and G.J. Randolph, *Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets*. Immunobiology, 2006. **211**(6-8): p. 609-18.
11. Glod, J., et al., *Monocytes form a vascular barrier and participate in vessel repair after brain injury*. Blood, 2006. **107**(3): p. 940-6.
12. Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann, *Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 669-92.
13. Afdhal, N.H., *The natural history of hepatitis C*. Semin Liver Dis, 2004. **24 Suppl 2**: p. 3-8.
14. Halliday, J., P. Klenerman, and E. Barnes, *Vaccination for hepatitis C virus: closing in on an evasive target*. Expert Rev Vaccines, 2011. **10**(5): p. 659-72.
15. Munir, S., et al., *Hepatitis C treatment: current and future perspectives*. Virol J, 2010. **7**: p. 296.
16. Sulkowski, M.S., et al., *Management of adverse effects of Peg-IFN and ribavirin therapy for hepatitis C*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011. **8**(4): p. 212-23.
17. McHutchison, J.G., et al., *Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection*. N Engl J Med, 2009. **360**(18): p. 1827-38.
18. Kwo, P.Y., et al., *Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naïve patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial*. Lancet, 2010. **376**(9742): p. 705-16.
19. Choo, Q.L., et al., *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome*. Science, 1989. **244**(4902): p. 359-62.
20. Perrault, M. and E.I. Pecheur, *The hepatitis C virus and its hepatic environment: a toxic but finely tuned partnership*. Biochem J, 2009. **423**(3): p. 303-14.
21. Simmonds, P., et al., *Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes*. Hepatology, 2005. **42**(4): p. 962-73.
22. Dustin, L.B. and C.M. Rice, *Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 71-99.

23. Pham, T.N., et al., *Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of hepatitis C*. J Virol, 2004. **78**(11): p. 5867-74.
24. Nunez, O., et al., *Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins*. Gut, 2004. **53**(11): p. 1665-72.
25. Hassan, M., et al., *Hepatitis C virus core protein triggers hepatic angiogenesis by a mechanism including multiple pathways*. Hepatology, 2009. **49**(5): p. 1469-82.
26. Mazzocca, A., et al., *Binding of hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 up-regulates matrix metalloproteinase-2 in human hepatic stellate cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(12): p. 11329-39.
27. *National Institutes of Health Consensus Development Conference statement Management of Hepatitis C: 2002 June 10-12, 2002*. HIV Clin Trials, 2003. **4**(1): p. 55-75.
28. Fartoux, L., et al., *Effect of prolonged interferon therapy on the outcome of hepatitis C virus-related cirrhosis: a randomized trial*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2007. **5**(4): p. 502-7.
29. Raoul, J.L., *Natural history of hepatocellular carcinoma and current treatment options*. Semin Nucl Med, 2008. **38**(2): p. S13-8.
30. DuBray, B.J., Jr., W.C. Chapman, and C.D. Anderson, *Hepatocellular carcinoma: a review of the surgical approaches to management*. Mo Med, 2011. **108**(3): p. 195-8.
31. Manns, M.P., et al., *Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial*. Lancet, 2001. **358**(9286): p. 958-65.
32. Fried, M.W., et al., *Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection*. N Engl J Med, 2002. **347**(13): p. 975-82.
33. Di Bisceglie, A.M., *Hepatitis C*. Lancet, 1998. **351**(9099): p. 351-5.
34. Chen, S.L. and T.R. Morgan, *The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection*. Int J Med Sci, 2006. **3**(2): p. 47-52.
35. Pineda, J.A., et al., *HIV coinfection shortens the survival of patients with hepatitis C virus-related decompensated cirrhosis*. Hepatology, 2005. **41**(4): p. 779-89.
36. Minuk, G.Y., *The influence of host factors on the natural history of chronic hepatitis C viral infections*. J Viral Hepat, 1999. **6**(4): p. 271-6.
37. Deng, L.P., et al., *Impact of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(8): p. 996-1003.
38. Siu, L., J. Foont, and J.R. Wands, *Hepatitis C virus and alcohol*. Semin Liver Dis, 2009. **29**(2): p. 188-99.
39. Poynard, T., P. Bedossa, and P. Opolon, *Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups*. Lancet, 1997. **349**(9055): p. 825-32.
40. Chuang, S.C., et al., *Interaction between cigarette smoking and hepatitis B and C virus infection on the risk of liver cancer: a meta-analysis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010. **19**(5): p. 1261-8.
41. Yoshida, H., et al., *Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: national surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. IHIT Study Group. Inhibition of Hepatocarcinogenesis by Interferon Therapy*. Ann Intern Med, 1999. **131**(3): p. 174-81.
42. Hadziyannis, S.J., et al., *Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose*. Ann Intern Med, 2004. **140**(5): p. 346-55.

43. Awad, T., et al., *Peginterferon alpha-2a is associated with higher sustained virological response than peginterferon alfa-2b in chronic hepatitis C: systematic review of randomized trials*. Hepatology, 2010. **51**(4): p. 1176-84.
44. Trapero-Marugan, M., et al., *Treatment regimens for patients with chronic hepatitis C*. Minerva Gastroenterol Dietol, 2008. **54**(2): p. 209-17.
45. Saiz de la Hoya, P., et al., *Hepatitis C and B prevalence in Spanish prisons*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011. **30**(7): p. 857-62.
46. Ghany, M.G., et al., *Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update*. Hepatology, 2009. **49**(4): p. 1335-74.
47. Pawlotsky, J.M., et al., *Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C*. Gastroenterology, 2004. **126**(3): p. 703-14.
48. Zein, N.N., et al., *Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy*. Collaborative Study Group. Ann Intern Med, 1996. **125**(8): p. 634-9.
49. Koziel, M.J. and M.G. Peters, *Viral hepatitis in HIV infection*. N Engl J Med, 2007. **356**(14): p. 1445-54.
50. Idrees, M. and S. Riazuddin, *Frequency distribution of hepatitis C virus genotypes in different geographical regions of Pakistan and their possible routes of transmission*. BMC Infect Dis, 2008. **8**: p. 69.
51. Demirturk, N., et al., *Hepatitis B and C virus in West-Central Turkey: seroprevalence in healthy individuals admitted to a university hospital for routine health checks*. Turk J Gastroenterol, 2006. **17**(4): p. 267-72.
52. Khokhar, N., M.L. Gill, and G.J. Malik, *General seroprevalence of hepatitis C and hepatitis B virus infections in population*. J Coll Physicians Surg Pak, 2004. **14**(9): p. 534-6.
53. Gangaidzo, I.T., et al., *Hepatitis C virus in Zimbabwe*. Cent Afr J Med, 1997. **43**(5): p. 122-5.
54. McHutchison, J.G., et al., *The face of future hepatitis C antiviral drug development: recent biological and virologic advances and their translation to drug development and clinical practice*. J Hepatol, 2006. **44**(2): p. 411-21.
55. Thimme, R., V. Lohmann, and F. Weber, *A target on the move: innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus*. Antiviral Res, 2006. **69**(3): p. 129-41.
56. Thimme, R., et al., *Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15661-8.
57. Rehmann, B. and M. Nascimbeni, *Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(3): p. 215-29.
58. Pachiadakis, I., et al., *Is hepatitis C virus infection of dendritic cells a mechanism facilitating viral persistence?* Lancet Infect Dis, 2005. **5**(5): p. 296-304.
59. He, X.S., et al., *Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(10): p. 5692-7.
60. Day, C.L., et al., *Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection*. J Virol, 2002. **76**(24): p. 12584-95.
61. Bowen, D.G. and C.M. Walker, *Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection*. Nature, 2005. **436**(7053): p. 946-52.
62. Steinman, R.M. and H. Hemmi, *Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **311**: p. 17-58.
63. Sumpter, R., Jr., et al., *Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I*. J Virol, 2005. **79**(5): p. 2689-99.
64. Li, K., et al., *Distinct poly(I-C) and virus-activated signaling pathways leading to interferon-beta production in hepatocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 16739-47.

65. Pang, K.R., et al., *Biological and clinical basis for molecular studies of interferons*. Methods Mol Med, 2005. **116**: p. 1-23.
66. Shin, E.C., et al., *Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection*. J Clin Invest, 2006. **116**(11): p. 3006-14.
67. Miller, D.M., et al., *Interferon lambda as a potential new therapeutic for hepatitis C*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1182**: p. 80-7.
68. Kaisho, T. and S. Akira, *Critical roles of Toll-like receptors in host defense*. Crit Rev Immunol, 2000. **20**(5): p. 393-405.
69. Jinushi, M., et al., *Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection*. J Immunol, 2004. **173**(10): p. 6072-81.
70. Takehara, T. and N. Hayashi, *Natural killer cells in hepatitis C virus infection: from innate immunity to adaptive immunity*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2005. **3**(10 Suppl 2): p. S78-81.
71. Khakoo, S.I., et al., *HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection*. Science, 2004. **305**(5685): p. 872-4.
72. Szabo, G. and A. Dolganiuc, *Hepatitis C and innate immunity: recent advances*. Clin Liver Dis, 2008. **12**(3): p. 675-92, x.
73. Geissmann, F., et al., *Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(5): p. 398-408.
74. Varol, C., S. Yona, and S. Jung, *Origins and tissue-context-dependent fates of blood monocytes*. Immunol Cell Biol, 2009. **87**(1): p. 30-8.
75. Liang, H., et al., *Differential effects of hepatitis C virus JFH1 on human myeloid and plasmacytoid dendritic cells*. J Virol, 2009. **83**(11): p. 5693-707.
76. Rodrigue-Gervais, I.G., et al., *Poly(I:C) and lipopolysaccharide innate sensing functions of circulating human myeloid dendritic cells are affected in vivo in hepatitis C virus-infected patients*. J Virol, 2007. **81**(11): p. 5537-46.
77. Takaki, A., et al., *Hepatitis C virus NS4 protein impairs the Th1 polarization of immature dendritic cells*. J Viral Hepat, 2010. **17**(8): p. 555-62.
78. Waggoner, S.N., C.H. Hall, and Y.S. Hahn, *HCV core protein interaction with gC1q receptor inhibits Th1 differentiation of CD4+ T cells via suppression of dendritic cell IL-12 production*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(6): p. 1407-19.
79. Dolganiuc, A., et al., *Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation*. J Immunol, 2003. **170**(11): p. 5615-24.
80. Lopez, M., V. Soriano, and J.M. Benito, *Escape mutations in HIV infection and its impact on CD8+ T cell responses*. Curr Mol Med, 2007. **7**(5): p. 446-58.
81. Lechner, F., et al., *Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus*. J Exp Med, 2000. **191**(9): p. 1499-512.
82. Racanelli, V. and B. Rehermann, *Hepatitis C virus infection: when silence is deception*. Trends Immunol, 2003. **24**(8): p. 456-64.
83. Simpson, K.J., et al., *Chemokines in the pathogenesis of liver disease: so many players with poorly defined roles*. Clin Sci (Lond), 2003. **104**(1): p. 47-63.
84. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. Nat Med, 1995. **1**(1): p. 27-31.
85. Medina, J., et al., *Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease*. Hepatology, 2004. **39**(5): p. 1185-95.
86. Friedman, S.L., *Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2004. **1**(2): p. 98-105.

87. Rosmorduc, O., et al., *Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis*. Am J Pathol, 1999. **155**(4): p. 1065-73.
88. Corpechot, C., et al., *Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis*. Hepatology, 2002. **35**(5): p. 1010-21.
89. Carmeliet, P., *Angiogenesis in health and disease*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 653-60.
90. Pugh, C.W. and P.J. Ratcliffe, *Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 677-84.
91. Murohara, T., et al., *Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia*. J Clin Invest, 1998. **101**(11): p. 2567-78.
92. Majano, P.L., et al., *Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis. Evidence for a virus-induced gene upregulation*. J Clin Invest, 1998. **101**(7): p. 1343-52.
93. Majano, P., et al., *Hepatitis B virus X protein transactivates inducible nitric oxide synthase gene promoter through the proximal nuclear factor kappaB-binding site: evidence that cytoplasmic location of X protein is essential for gene transactivation*. Hepatology, 2001. **34**(6): p. 1218-24.
94. Jackson, C., *Matrix metalloproteinases and angiogenesis*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2002. **11**(3): p. 295-9.
95. Hiraoka, N., et al., *Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins*. Cell, 1998. **95**(3): p. 365-77.
96. Valfre di Bonzo, L., et al., *Angiogenesis and liver fibrogenesis*. Histol Histopathol, 2009. **24**(10): p. 1323-41.
97. Kalluri, R., *Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 422-33.
98. Thurston, G., et al., *Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 460-3.
99. Carlson, T.R., et al., *Direct cell adhesion to the angiopoietins mediated by integrins*. J Biol Chem, 2001. **276**(28): p. 26516-25.
100. Sanz-Cameno, P., et al., *Hepatitis B virus promotes angiopoietin-2 expression in liver tissue: role of HBV x protein*. Am J Pathol, 2006. **169**(4): p. 1215-22.
101. Jones, M.K., et al., *Isolation and characterization of rat gastric microvascular endothelial cells as a model for studying gastric angiogenesis in vitro*. J Physiol Pharmacol, 2000. **51**(4 Pt 2): p. 813-20.
102. Arai, F., et al., *Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche*. Cell, 2004. **118**(2): p. 149-61.
103. Tanaka, H., et al., *Hypoxia-independent overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha as an early change in mouse hepatocarcinogenesis*. Cancer Res, 2006. **66**(23): p. 11263-70.
104. Fiedler, U., et al., *Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation*. Nat Med, 2006. **12**(2): p. 235-9.
105. Hu, B., et al., *Angiopoietin-2 induces human glioma invasion through the activation of matrix metalloprotease-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(15): p. 8904-9.
106. Salcedo, X., et al., *Review article: angiogenesis soluble factors as liver disease markers*. Aliment Pharmacol Ther, 2005. **22**(1): p. 23-30.
107. Salcedo, X., et al., *The potential of angiogenesis soluble markers in chronic hepatitis C*. Hepatology, 2005. **42**(3): p. 696-701.
108. Romero, M., et al., *Intrahepatic expression of inducible nitric oxide synthase in acute liver allograft rejection: evidence of modulation by corticosteroids*. Liver Transpl, 2001. **7**(1): p. 16-21.
109. Medina, J., et al., *Evidence of angiogenesis in primary biliary cirrhosis: an immunohistochemical descriptive study*. J Hepatol, 2005. **42**(1): p. 124-31.

110. Medina, J., et al., *Hepatocyte growth factor activates endothelial proangiogenic mechanisms relevant in chronic hepatitis C-associated neoangiogenesis*. J Hepatol, 2003. **38**(5): p. 660-7.
111. Garcia-Monzon, C., et al., *Vascular adhesion molecule expression in viral chronic hepatitis: evidence of neoangiogenesis in portal tracts*. Gastroenterology, 1995. **108**(1): p. 231-41.
112. Chaparro, M., et al., *Mechanisms of angiogenesis in chronic inflammatory liver disease*. Ann Hepatol, 2007. **6**(4): p. 208-13.
113. Ziegler-Heitbrock, L., *The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(3): p. 584-92.
114. Urra, X., et al., *Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke*. J Cereb Blood Flow Metab, 2009. **29**(5): p. 994-1002.
115. Mizuno, K., et al., *Selective expansion of CD16highCCR2- subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation*. Clin Exp Immunol, 2005. **142**(3): p. 461-70.
116. Kuwana, M., et al., *Endothelial differentiation potential of human monocyte-derived multipotential cells*. Stem Cells, 2006. **24**(12): p. 2733-43.
117. Rehman, J., et al., *Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors*. Circulation, 2003. **107**(8): p. 1164-9.
118. Venneri, M.A., et al., *Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer*. Blood, 2007. **109**(12): p. 5276-85.
119. Seki, E., et al., *CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(7): p. 1858-70.
120. Mitchell, C., et al., *Dual role of CCR2 in the constitution and the resolution of liver fibrosis in mice*. Am J Pathol, 2009. **174**(5): p. 1766-75.
121. Karlmark, K.R., et al., *Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis*. Hepatology, 2009. **50**(1): p. 261-74.
122. Imamura, M., et al., *Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats*. Gastroenterology, 2005. **128**(1): p. 138-46.
123. Heymann, F., C. Trautwein, and F. Tacke, *Monocytes and macrophages as cellular targets in liver fibrosis*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2009. **8**(4): p. 307-18.
124. Duffield, J.S., et al., *Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair*. J Clin Invest, 2005. **115**(1): p. 56-65.
125. Klein, I., et al., *Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow derived and sessile hepatic macrophages*. Blood, 2007. **110**(12): p. 4077-85.
126. Lewis, C.E. and J.W. Pollard, *Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 605-12.
127. Condeelis, J. and J.W. Pollard, *Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis*. Cell, 2006. **124**(2): p. 263-6.
128. Murdoch, C., A. Giannoudis, and C.E. Lewis, *Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues*. Blood, 2004. **104**(8): p. 2224-34.
129. De Palma, M., et al., *Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications*. Trends Immunol, 2007. **28**(12): p. 519-24.
130. Ribatti, D., *The paracrine role of Tie-2-expressing monocytes in tumor angiogenesis*. Stem Cells Dev, 2009. **18**(5): p. 703-6.
131. De Palma, M. and L. Naldini, *Tie2-expressing monocytes (TEMs): novel targets and vehicles of anticancer therapy?* Biochim Biophys Acta, 2009. **1796**(1): p. 5-10.

132. Makinde, T. and D.K. Agrawal, *Intra and extravascular transmembrane signalling of angiopoietin-1-Tie2 receptor in health and disease*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(3): p. 810-28.
133. Noonan, D.M., et al., *Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions*. Cancer Metastasis Rev, 2008. **27**(1): p. 31-40.
134. Fiedler, U. and H.G. Augustin, *Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation*. Trends Immunol, 2006. **27**(12): p. 552-8.
135. Abe, T., et al., *Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines*. J Virol, 2007. **81**(17): p. 8953-66.
136. Szabo, G. and A. Dolganiuc, *Subversion of plasmacytoid and myeloid dendritic cell functions in chronic HCV infection*. Immunobiology, 2005. **210**(2-4): p. 237-47.
137. Duesberg, U., et al., *Cell activation by synthetic lipopeptides of the hepatitis C virus (HCV)--core protein is mediated by toll like receptors (TLRs) 2 and 4*. Immunol Lett, 2002. **84**(2): p. 89-95.
138. Dolganiuc, A., et al., *Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation*. Gastroenterology, 2004. **127**(5): p. 1513-24.
139. Feldmann, G., et al., *Induction of interleukin-6 by hepatitis C virus core protein in hepatitis C-associated mixed cryoglobulinemia and B-cell non-Hodgkin's lymphoma*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(15): p. 4491-8.
140. Zimmermann, H.W., et al., *Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis*. PLoS One. **5**(6): p. e11049.
141. Fingerle, G., et al., *The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients*. Blood, 1993. **82**(10): p. 3170-6.
142. Ancuta, P., et al., *Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes*. J Exp Med, 2003. **197**(12): p. 1701-7.
143. Grip, O., et al., *Increased subpopulations of CD16(+) and CD56(+) blood monocytes in patients with active Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(5): p. 566-72.
144. Seki, E., et al., *TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis*. Nat Med, 2007. **13**(11): p. 1324-32.
145. Pulaski, H.L., et al., *Identifying alemtuzumab as an anti-myeloid cell antiangiogenic therapy for the treatment of ovarian cancer*. J Transl Med, 2009. **7**: p. 49.
146. Lewis, C.E. and R. Hughes, *Inflammation and breast cancer. Microenvironmental factors regulating macrophage function in breast tumours: hypoxia and angiopoietin-2*. Breast Cancer Res, 2007. **9**(3): p. 209.
147. Nowak, G., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 or Tie-2 on peripheral blood cells defines functionally competent cell populations capable of reendothelialization*. Circulation, 2004. **110**(24): p. 3699-707.
148. Pucci, F., et al., *A distinguishing gene signature shared by tumor-infiltrating Tie2-expressing monocytes, blood "resident" monocytes, and embryonic macrophages suggests common functions and developmental relationships*. Blood, 2009. **114**(4): p. 901-14.
149. Sanz-Cameno, P., et al., *Intrahepatic angiopoietin-2 protein expression modulation by hepatitis C virus: MAPK, PI3K and reactive oxygen species (ROS) implication*. Journal of Hepatology 2008. **48**: p. S230-S231.
150. Murdoch, C., et al., *Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 7405-11.
151. Figueroa-Vega, N., et al., *Serum levels of angiogenic molecules in autoimmune thyroid diseases and their correlation with laboratory and clinical features*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(4): p. 1145-53.

152. Gabriel, A., et al., *Angiogenesis in chronic hepatitis C is associated with inflammatory activity grade and fibrosis stage*. *Pathol Res Pract*, 2009. **205**(11): p. 758-64.
153. Hisai, H., et al., *Increased expression of angiogenin in hepatocellular carcinoma in correlation with tumor vascularity*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(13): p. 4852-9.
154. Autiero, M., et al., *Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1*. *Nat Med*, 2003. **9**(7): p. 936-43.
155. Adini, A., et al., *Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages*. *Cancer Res*, 2002. **62**(10): p. 2749-52.
156. Odorisio, T., et al., *Mice overexpressing placenta growth factor exhibit increased vascularization and vessel permeability*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(Pt 12): p. 2559-67.
157. Hattori, K., et al., *Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment*. *Nat Med*, 2002. **8**(8): p. 841-9.
158. Pinzani, M., et al., *Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis*. *Am J Pathol*, 1996. **148**(3): p. 785-800.
159. Ikura, Y., et al., *Expression of platelet-derived growth factor and its receptor in livers of patients with chronic liver disease*. *J Gastroenterol*, 1997. **32**(4): p. 496-501.
160. Lindahl, P., et al., *Endothelial-perivascular cell signaling in vascular development: lessons from knockout mice*. *Curr Opin Lipidol*, 1998. **9**(5): p. 407-11.
161. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. *Nat Med*, 2000. **6**(4): p. 389-95.
162. Friedman, S.L., *Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(4): p. 2247-50.
163. Semela, D., et al., *Platelet-derived growth factor signaling through ephrin-b2 regulates hepatic vascular structure and function*. *Gastroenterology*, 2008. **135**(2): p. 671-9.
164. Aleffi, S., et al., *Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells*. *Hepatology*, 2005. **42**(6): p. 1339-48.
165. Vespasiani-Gentilucci, U., et al., *Angiogenic cytokines in patients undergoing antiviral treatment for chronic hepatitis C virus infection*. *J Interferon Cytokine Res*, 2011. **31**(2): p. 207-10.
166. Takahara, T., et al., *Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human livers*. *Hepatology*, 1997. **26**(6): p. 1521-9.
167. Lichtinghagen, R., et al., *Expression and coordinated regulation of matrix metalloproteinases in chronic hepatitis C and hepatitis C virus-induced liver cirrhosis*. *Clin Sci (Lond)*, 2003. **105**(3): p. 373-82.
168. Lara-Pezzi, E., et al., *The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(12): p. 1831-8.
169. Mas, V.R., et al., *Angiogenesis soluble factors as hepatocellular carcinoma noninvasive markers for monitoring hepatitis C virus cirrhotic patients awaiting liver transplantation*. *Transplantation*, 2007. **84**(10): p. 1262-71.
170. Mann, C.D., et al., *Prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma: a systematic review*. *Eur J Cancer*, 2007. **43**(6): p. 979-92.
171. Grunewald, M., et al., *VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells*. *Cell*, 2006. **124**(1): p. 175-89.
172. Fiedler, U., et al., *The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies*. *Blood*, 2004. **103**(11): p. 4150-6.
173. Torimura, T., et al., *Overexpression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in hepatocellular carcinoma*. *J Hepatol*, 2004. **40**(5): p. 799-807.

174. Novo, E., et al., *Proangiogenic cytokines as hypoxia-dependent factors stimulating migration of human hepatic stellate cells*. Am J Pathol, 2007. **170**(6): p. 1942-53.
175. Tanaka, S., et al., *Tie2 vascular endothelial receptor expression and function in hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2002. **35**(4): p. 861-7.
176. Peters, K.G., et al., *Expression of Tie2/Tek in breast tumour vasculature provides a new marker for evaluation of tumour angiogenesis*. Br J Cancer, 1998. **77**(1): p. 51-6.
177. Bertolotti, A. and C. Ferrari, *Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection*. Hepatology, 2003. **38**(1): p. 4-13.
178. Langenkamp, A., et al., *Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 311-6.
179. Servet-Delprat, C., et al., *Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand-activated human dendritic cells*. J Immunol, 2000. **164**(4): p. 1753-60.
180. Pollara, G., et al., *Herpes simplex virus infection of dendritic cells: balance among activation, inhibition, and immunity*. J Infect Dis, 2003. **187**(2): p. 165-78.
181. Moutafsi, M., et al., *Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells*. Blood, 2002. **99**(8): p. 2913-21.
182. Engelmayer, J., et al., *Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion*. J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6762-8.
183. Auffermann-Gretzinger, S., E.B. Keefe, and S. Levy, *Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection*. Blood, 2001. **97**(10): p. 3171-6.
184. Tait, C.R. and P.F. Jones, *Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch*. J Pathol, 2004. **204**(1): p. 1-10.

PUBLICACIÓN

Peripheral blood monocyte subsets predict antiviral response in chronic hepatitis C

Y. Rodríguez-Muñoz*, S. Martín-Vílchez*, R. López-Rodríguez*, Á. Hernández-Bartolomé*, M. Trapero-Marugán*, M. J. Borque†, R. Moreno-Otero*,¹ & P. Sanz-Cameno*,¹

*Liver Unit, IIS Hospital Universitario de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid & Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd, funded by Instituto de Salud Carlos III), Madrid, Spain.

†Molecular Biology Unit, IIS Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, Spain.

Correspondence to:

Dr R. Moreno-Otero, Liver Unit (3rd floor) and CIBERehd, Hospital Universitario de la Princesa, Diego de León 62, E-28006-Madrid, Spain.
E-mail: rmoreno.hlpr@salud.madrid.org

¹Both authors share senior authorship and contributed equally to this work.

Publication data

Submitted 7 April 2011
First decision 26 April 2011
Resubmitted 6 July 2011
Accepted 22 July 2011

SUMMARY

Background

Hepatitis C virus infection evolves into chronic progressive liver disease in a significant percentage of patients. Monocytes constitute a diverse group of myeloid cells that mediate innate and adaptive immune response. In addition to proinflammatory CD16+ monocytes, a Tie-2+ subgroup – Tie-2 expressing monocytes (TEMs) – that has robust proangiogenic potential has been recently defined.

Aim

To study the heterogeneity of peripheral blood monocytes in chronic hepatitis C (CHC) patients, to examine their proposed pathophysiological roles on disease progression and response to antiviral therapy.

Methods

We studied CD16+ and Tie-2+ peripheral monocyte subpopulations in 21 healthy subjects and 39 CHC patients in various stages of disease and responses to antiviral treatment using flow cytometry. Expression profiles of proangiogenic and tissue remodelling factors in monocyte supernatants were measured using ELISA and protein arrays. Intrahepatic expression of CD14, CD31 and Tie-2 was analysed using immunofluorescence.

Results

Increases of certain peripheral monocyte subsets were observed in the blood of CHC patients, wherein those cells with proinflammatory (CD16+) or proangiogenic (TEMs) potential expanded ($P < 0.005$, both). Notably, TEMs were significantly increased in nonresponders, particularly those with lower CD16 expression. In addition, many angiogenic factors were differentially expressed by peripheral monocytes from control or CHC patients, such as angiopoietin-1 and angiogenin ($P < 0.05$). Interestingly, intrahepatic TEMs were distinguished within portal infiltrates of CHC patients.

Conclusions

These findings suggest for the first time the relevance of peripheral monocytes phenotypes for the achievement of response to treatment. Hence, the study of monocyte subset regulation might effect improved CHC prognoses and adjuvant therapies.

Aliment Pharmacol Ther

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) infection affects a significant percentage of the world's population and has been proposed to be the main cause of liver transplantation and hepatocellular carcinoma in developed countries. The majority of patients who suffer an acute infection develop chronic hepatitis C (CHC) due to dysregulation of immune system responses, whereby they are unable to eradicate HCV, allowing immune-mediated liver damage to perpetuate.^{1, 2}

Leucocyte recruitment to the liver across the vascular endothelium is critical for viral clearance in acute hepatitis and for the pathogenesis of chronic inflammatory liver disease.^{3–5} The characteristic liver infiltrates that form in CHC comprise primarily mononuclear inflammatory cells and are accompanied by the development of abnormal intrahepatic microcapillary structures.^{6–8} These manifestations clearly reflect the alteration of the architecture and function of the liver vasculature.

Endothelial activation is essential for triggering the immune response and mediating vascular and tissue remodelling – processes that cells of the innate immune system regulate.⁹ Among such cells, monocytes have pivotal functions in adaptive immunity, in addition to their central role in the innate immune response, and constitute one of the most important immune mediators of physiological and pathological vascular remodelling.^{10–13}

Recently, studies have documented the heterogeneity of this subgroup of circulating myeloid cells, which perform broad functions through specific contributions of diverse monocyte subsets in distinct steps of the immune response and during vessel formation and maturation.^{14–17} Peripheral monocytes which express the Fcγ receptor III, CD16, release higher levels of proinflammatory cytokines, have better antigen presentation efficacy, and undergo greater extravasation, properties that explain their frequent association with the pathogenesis of multiple diseases.^{18–20}

Another monocyte subset, known as TEMs (for Tie-2 expressing monocytes), defined by the expression of the tyrosine kinase receptor Tie-2, comprises a subgroup of circulating monocytes that are recruited to sites of proangiogenic activity across a concentration gradient of Tie-2 ligands, angiopoietins, which are differentially released by injured tissues.^{19, 21–23} The immaturity or inability of TEMs to mediate antigen presentation reflects their identity as an innate immunosuppressive cell type that appears to be committed to tissue remodelling by its robust proangiogenic properties.²⁴

TEMs are essential for the establishment and maturation of tumour-related vessels, implicating them in the 'tumour angiogenic switch';²⁵ nonetheless, they are clearly distinguished from tumour-associated macrophages (TAMs), based on the crucial and nonredundant tumour proangiogenic properties of TEMs as their depletion impairs tumour-related angiogenesis despite the presence of TAMs.^{26, 27} Moreover, increasing evidence demonstrates the potential contribution of TEMs to the pathogenesis of many nontumoral diseases, such as diabetic retinopathy, stroke, arthritis and other chronic inflammatory illnesses;²⁸ thus, TEMs can account for the close relationship between inflammation and angiogenesis.^{9, 29}

Because CHC is characterised by intrahepatic inflammation, neoangiogenesis and imbalances in angiopoietin expression, which often lead to cirrhosis and hepatocellular carcinoma, we focused on studying the proinflammatory (CD16+) and proangiogenic (Tie-2+) monocyte subsets in peripheral blood of control subjects and patients with CHC, as a model of immune-mediated liver damage, to assess their role on the regulation of the progression of CHC and patients' responses to antiviral therapy. Moreover, we analysed the expression of angiogenesis and tissue remodelling factors by circulating monocytes and examined the intrahepatic occurrence of TEMs to gain a better understanding of their regulation of CHC-related pathophysiology and identify novel molecular markers and therapeutic targets.

MATERIALS AND METHODS

Patients and healthy donors

Thirty-nine patients with CHC were included in this study; their demographic characteristics are shown in Table 1.

All patients were confirmed to be positive for HCV RNA (Cobas Amplicor Hepatitis C Monitor Test, v2.0 Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) and negative for antibodies against hepatitis B virus and human immunodeficiency virus. No autoantibody reactivity was observed in any patient or control.

Patients were divided into three groups based on their response to current antiviral treatment: naïve, without pharmacological treatment ($n = 8$); responders, who had sustained virological response ($n = 16$); and nonresponders ($n = 15$), in whom the viraemia persisted. The treatment protocol consisted of standard care with combination therapy of Peg-Interferon plus Ribavirin.

Table 1 | Baseline characteristics of controls and chronic hepatitis C (CHC) patients

	Controls		Total CHC		Responders		Nonresponders		Naives	
	11/10		22/17		7/9		10/5		5/3	
Sex (M/F)	Median	Range	Median	Range	Median	Range	Median	Range	Median	Range
Age (years)	46	30–82	51	32–76	46	40–67	50	32–59	59	42–76
Disease duration (years)*	N	N	8	1–20	5	1–20	8	2–19	6	1–20
	Median	95% CI	Median	95% CI	Median	95% CI	Median	95% CI	Median	95% CI
% Peripheral monocytes	7,8	6,5–9,6	9,6	8,9–10,8	10,6	8,6–13,2	10,2	8,6–11,1	7,8	6,2–10,2
Viral load (U mL ⁻¹) × 10 ⁵	N	N	2,7	3,7–11,1	0	0	4,7	4,3–13,2	13,5	1,9–31,0
GOT (U L ⁻¹)	15,7	12,8–18,7	36,0	35,1–52,4	30,0	24,9–35,0	36,5	34,6–60,8	41,5	24,5–85,7
GPT (U L ⁻¹)	18,0	11,2–29,5	39,5	36,6–64,1	28,0	21,1–36,0	48,0	35,8–87,1	46,5	25,4–99,0
G-GT (U L ⁻¹)	13,0	5,8–27,3	45,0	45,6–75,5	38,0	23,3–63,2	45,0	40,8–87,2	58	32,8–129,6
Histological activity index										
Stage†	N	N	2	1,5–2,6	2,5	1,3–3,6	2	1,0–2,4	N	N
Grade	N	N	2	1,5–2,7	2	1,2–3,7	2	1,2–2,4	N	N

CI, confidence intervals; CHC, chronic hepatitis C; N, none; GOT, glutamic-oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic-pyruvic transaminase; G-GT, gamma-glutamyl transpeptidase.

* Disease duration is calculated as years since the detection of hepatitis C.

† The biopsy data correspond to pre-treatment stage.

Twenty-one healthy volunteers, matched for sex and age, were used as controls. They were confirmed to be negative for antibodies against hepatitis C and B viruses (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay, Architect[®] analyser, Abbott Diagnostics Division). Heparinised peripheral blood samples were collected from all patients and healthy controls for flow cytometry and expression analysis of angiogenesis and remodelling factors. Signed informed consent was obtained from all included individuals. The study was approved by the Ethical Committee of the Hospital Universitario de La Princesa and conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

Histological analysis

Liver biopsies, obtained for diagnostic purposes, were analysed histologically in the Pathology Service of the hospital (Dr. Asunción García-Sánchez) according to the METAVIR classification system, which scores fibrosis stages from F0 to F4 (F0, denotes the absence of fibrosis; F1, portal fibrosis without septa; F2, with few septa; F3, abundant septa without cirrhosis; F4, cirrhosis). The necroinflammatory activity was recorded on an A0 to A3 scale, wherein A0 represented the absence of activity, A1

denoted mild activity, A2 indicated moderate activity, and A3 denoted severe activity.

Cellular preparations and cultures

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from heparinised blood samples of HCV patients and healthy donors by density gradient centrifugation (Ficoll Hypaque, Sigma Co., St Louis, USA), according to standard protocols. Highly purified monocytes were isolated from PBMCs by MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, USA) by one-step positive selection of CD14⁺ cells with anti-CD14-coated magnetic microbeads.

The purified cells were cultured at 1×10^6 cells/mL in complete RPMI-1640 medium. Whole-cell-free supernatants from monocytes were collected after 24 h of culture by centrifugation at 12,000 g for 5 min and were stored at -80°C until expression analysis of angiogenesis and remodelling factors.

Flow cytometry

Monocyte surface expression of CD14, CD16 and Tie-2 was measured using direct staining with saturating concentrations of anti-CD14 (MoP9), anti-CD16 (3G8,) and

anti-Tie-2 (83715) monoclonal antibodies conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), allophycocyanin (APC) or phycoerythrin (PE) for 30 min at 4 °C in the dark (R&D Systems, Minneapolis, USA). APC-, FITC- and PE-conjugated isotype-matched controls were obtained from Becton Dickinson (Mountain View, CA). After staining, cells were washed with PBS, resuspended and analysed (4×10^4 acquired cells per experiment) on a FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA).

The phenotype of peripheral blood monocytes was examined with regard to the expression levels of CD14, CD16 and Tie-2, scored as follows: low (l), when the expression level was less than 10 units of mean intensity of fluorescence (MIF); and high (h), when it exceeded 10 MIF units.

Angiogenic and remodelling factors expression analysis
Angiopoietin 1 (Ang-1) and angiopoietin 2 (Ang-2) were quantified in the culture supernatants using ELISA (R&D Systems), according to the manufacturer's instructions. Measurements were made in duplicate. The remaining analysis of angiogenesis and remodelling factors was performed using the Quantibody Human Angiogenesis Array 1 and Quantibody Human MMP-1 Array (RayBiotech; Norcross, GA) to measure angiogenin, Epidermal growth factor (EGF), Basic Fibroblast Growth Factor (B-FGF), Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), Hepatic growth factor (HGF) leptin, Platelet-derived growth factor (PDGF-BB), Placental growth factor (PIGF), Vascular endothelial growth factor (VEGF), MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-13 (Matrix Metalloproteinases), TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-4 (Tissue inhibitor matrix metalloproteinase) according to the manufacturer's protocols. Fluorescent signals were visualised on an Axon GenePix laser scanner (Molecular Devices, LLC, California, USA) and the data were quantified using RayBio Q Analyzer software (Raybiotech, Norcross, GA).

Immunofluorescence assays of isolated peripheral monocytes and liver tissues

Freshly isolated monocytes were allowed to adhere to poli-L-lysine coated dishes in RPMI 1640 medium. After that, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilised with PBS plus 0.02% Tween-20 at 37 °C. Monocytes were then blocked with TNB and immunostained with antibodies specific for Tie-2, Ang-1 and Ang-2 (Santa Cruz biotechnology, California, USA) followed by AlexaFluor-568 or AlexaFluor-488-labelled

secondary reagent. Finally, slides were analysed with an epifluorescence Leica microscope (Leica, Wetzlar, Germany).

Tissue specimens were obtained from liver biopsies following informed consent according to the Declaration of Helsinki and the Hospital Universitario La Princesa Bioethical Committee. Samples were embedded in OCT compound and snap-frozen. Five-micrometre sections were fixed in acetone and blocked with TNB for 30 min. Then, the sections were stained with rabbit polyclonal anti-Tie-2 (Santa Cruz biotechnology) followed by AlexaFluor 568-conjugated antibody (Molecular Probes, Eugene, OR). To stain pericytes and endothelial cells were used: anti-CD31 (provided by Dr Sanchez Madrid) and anti- α -smooth muscle actin antibody (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) followed by AlexaFluor-488 and AlexaFluor-647 respectively (R&D Systems). To identify intrahepatic monocytes, liver sections were stained with APC or FITC conjugated anti-CD14 antibody (BD Biosciences, California, USA).

Confocal images were acquired using Leica TCS-SP confocal laser scanning unit equipped with Ar and He-Ne laser beams and attached to a Leica DMIRBE inverted epi-fluorescence microscope. We used the 40 \times objective and processed the images using Image J software.

Statistical analysis

Data for monocyte subpopulation proportions and angiogenic and remodelling factors were expressed as median \pm 95% confidence intervals (CI) and classified according to the following groups: controls and total CHC patients (naïve, responders and nonresponders when applicable). The statistical significance of differences between two groups was determined using non-parametric Mann-Whitney *U*-test and correlation coefficients were determined using Spearman's rank correlation. *P* values below 0.05 were considered significant. Data were analysed using SPSS, version 15.0, of the SPSS software package (SPSS Inc., Chicago, IL).

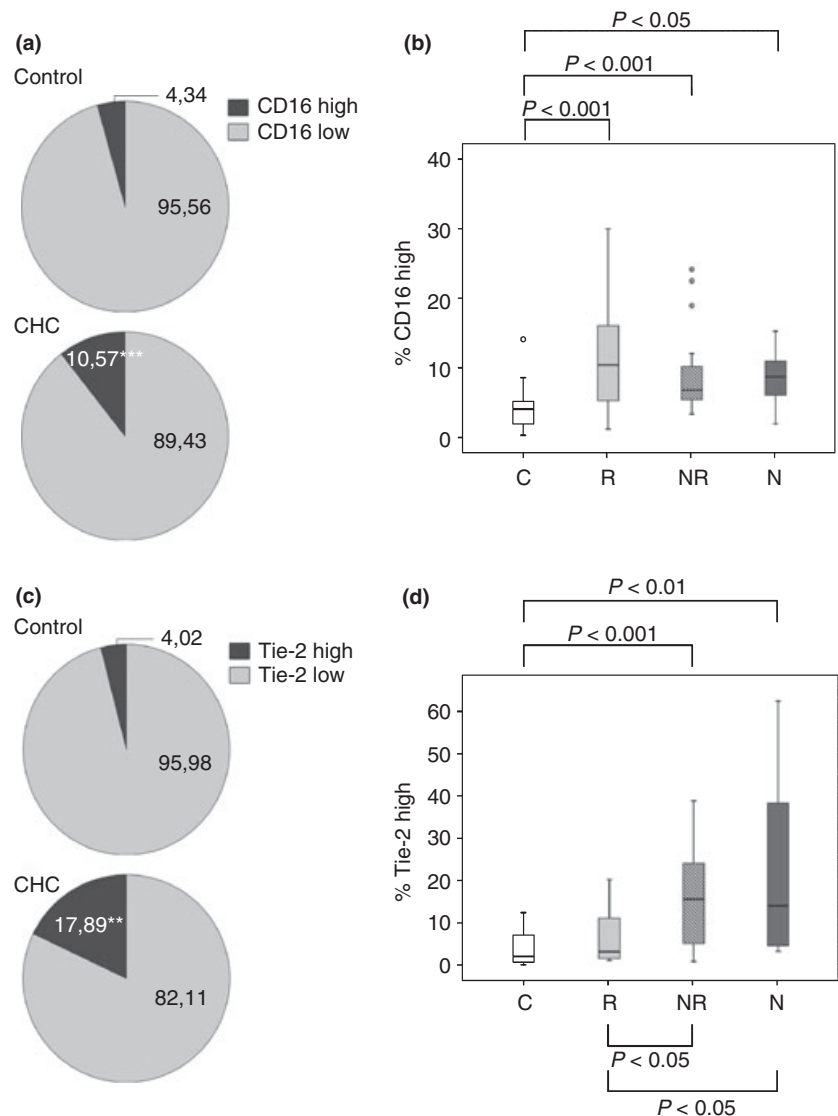
RESULTS

Proinflammatory and proangiogenic monocyte subsets are higher in CHC patients' peripheral blood

Peripheral subsets of CD16 and Tie-2 expressing monocytes were significantly enriched ($P = 0.001$ and $P = 0.002$, respectively) in CHC patients (Figures 1a, c).

When patients were analysed based on their response to treatment, we observed significant increments in the proportion of CD16h monocytes in all groups of CHC

Figure 1 | CD16 and Tie-2 expression by peripheral blood monocytes from healthy volunteers and chronic hepatitis C (CHC) patients. Peripheral blood proportions CD16^{high} and CD16^{low} (a), and Tie-2^{high} and Tie-2^{low} (c) monocytes from control subjects and CHC patients. Relative proportions of CD16^{high} and Tie-2^{high} expressing cells were significantly raised in peripheral blood of CHC patients compared with controls (** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ by Mann-Whitney U -test, respectively). Box plots show the median percentages $\pm 95\%$ CI and outlier values of CD16^h (b) and Tie-2^h (d) monocytes with regard to the response to treatment. C, Controls; R, Responders; NR, Nonresponders; N, Naïves.



patients in relation to controls (Figure 1b). Similar trends were obtained for TEMs but there was not statistic difference in the peripheral proportions of TEMs between controls and responders. However, the Tie-2h subpopulation in CHC patients (Figure 1d) was notably higher in naïve and nonresponders patients compared with responders ($P < 0.05$, both).

Supplementary analysis of these subtypes of monocytes regarding histological activity indices did not reflect any significant correlation (data not shown).

Multiparametric characterisation of peripheral CHC monocyte subpopulations

To characterise CD16 and TEMs further, we analysed their expression of CD16 and Tie-2 using double immunofluorescence. The chief peripheral monocyte populations in controls and CHC patients were CD14h/CD16l,

CD14h/Tie-2l and Tie-2l/CD16l. Similar to our results above, the proinflammatory and proangiogenic monocyte subsets (CD16h and Tie-2h, respectively) increased significantly in CHC patients compared with control subjects, independently they were Tie-2l or Tie-2h and CD16l or CD16h (Figure 2).

Notably, the Tie-2h/CD16l monocyte subset was significantly higher in CHC ($P < 0.01$), specially in naïve patients and nonresponders ($P < 0.05$, both) compared with responders (Figure 3).

A subsequent characterisation of Tie-2-positive monocytes (Tie-2+) within the various populations in the CD14/CD16 dot plot and the assessment of CD16-positive cells (CD16+) in the corresponding CD14/Tie-2 subgroups (Supplementary Figure S1) revealed a patent increase in the percentages of specific subsets in CHC patients compared with control subjects.

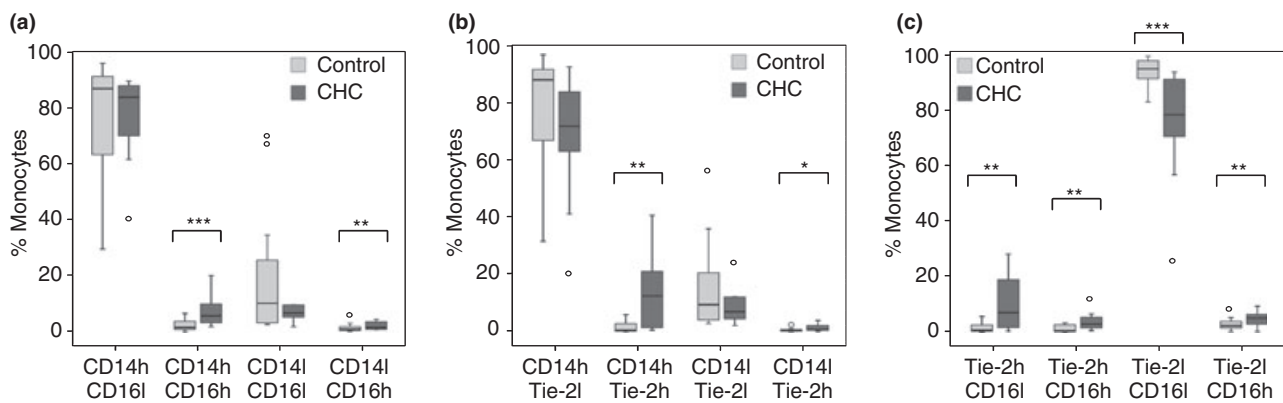


Figure 2 | Dual phenotyping of peripheral monocytes in control subjects and chronic hepatitis C (CHC) patients. Graphs display the median \pm 95% CI of the different CD14/CD16 (a), CD14/Tie-2 (b) and Tie-2/CD16 (c) monocyte subsets from all analysed controls and CHC patients. Statistical significance by Mann-Whitney *U*-test is shown as * for $P < 0.05$, ** for $P < 0.01$ and *** for $P < 0.001$.

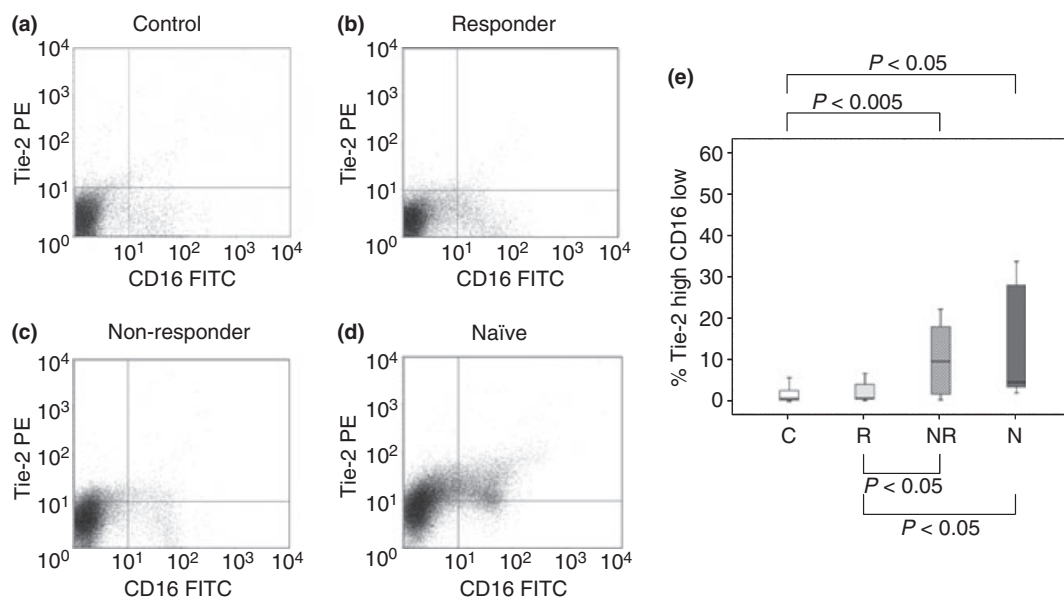


Figure 3 | Polarisation of peripheral monocyte subpopulations in chronic hepatitis C (CHC) patients based on their response to treatment. Tie-2/CD16 dot plots from representative control subject (a), responder (b), nonresponder (c) and naïve (d) CHC patients. An evident polarisation in the constitution of peripheral monocytes subsets from CHC patients to those which express higher levels of CD16 and Tie-2 can be appreciated. Tie-2h/CD16l monocyte subpopulation was significantly related to the type of response to antiviral treatment, being elevated in naïves and in nonresponders compared with responders ($P < 0.05$ by Mann-Whitney *U*-test). Absence of statistical significance was appreciated between responders and controls (e). Box plots show the median percentages \pm 95% CI without outlier values. C, Controls; R, Responders; NR, Nonresponders; N, Naïves.

All Tie-2+ populations, except for CD14l/CD16l cells, were significantly higher in CHC patients, whereas only CD16+ monocytes from the CD14h/Tie-2l and CD14h/Tie-2h populations increased in CHC patients ($P < 0.05$, all).

The proinflammatory monocyte subset correlates with percentage of peripheral monocytes and viral load in patients with CHC

The proportion of CD16h monocytes in CHC patients correlated directly with the percentage of peripheral

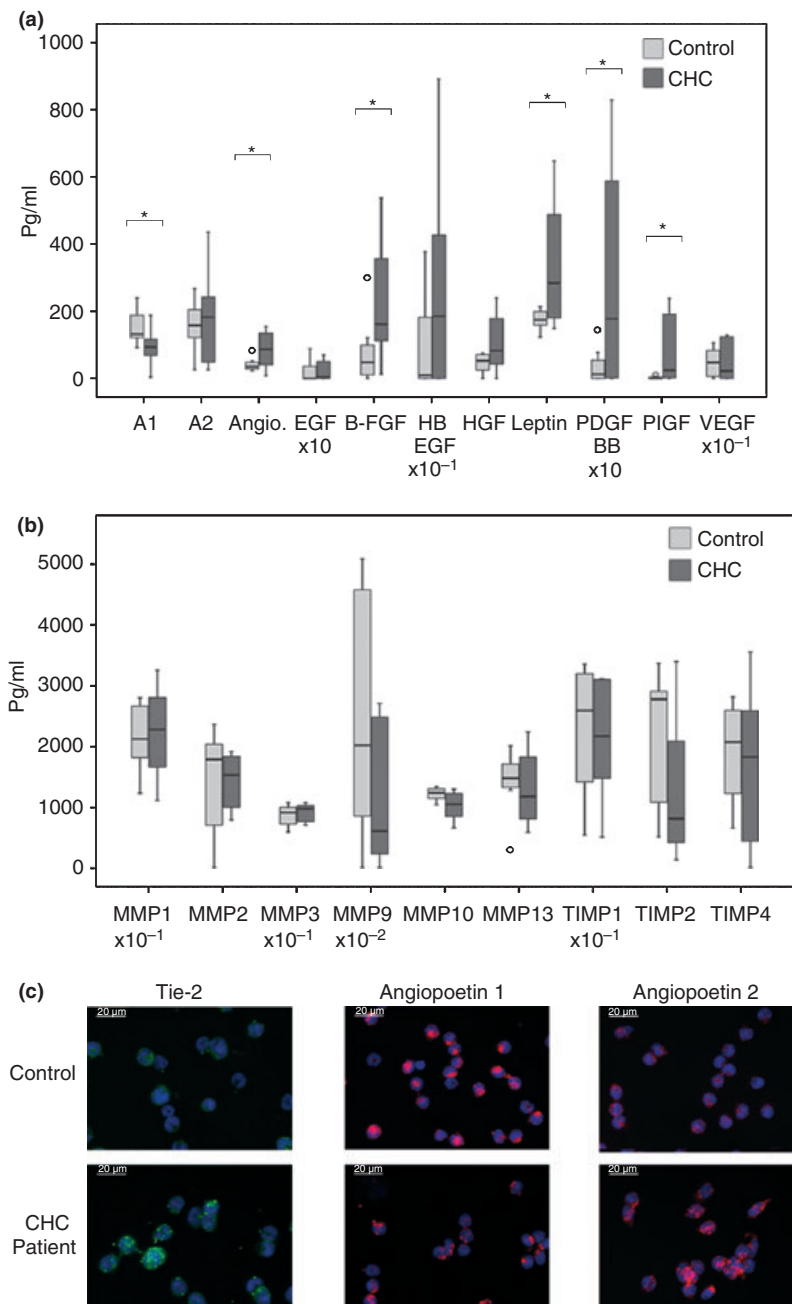


Figure 4 | Angiogenic and remodelling factors expression by peripheral monocytes from controls and chronic hepatitis C (CHC) patients. Except for Ang-1, all angiogenesis factors increased in the supernatants of CHC monocytes after 24 h of culture compared with controls (a). By contrast, the differences between remodelling factor concentrations in supernatants from cultured monocytes of controls and CHC patients did not reach statistical significance under any circumstance (b). Ang-1 and Ang-2 secretion was analysed using ELISA and the remaining factors were quantified using commercial immunofluorescence array, in which measurements were made in quadruplicate. Box plots illustrate the median concentration \pm 95% CI in pg/mL. Statistical significance analysed by Mann-Whitney *U*-test, displayed as $*$ ($P < 0.05$). The magnitude differences among concentrations are denoted by the corresponding $\times 10$ factor. A1: Angiopoietin 1; A2: Angiopoietin 2; Angio: Angiogenin. Immunofluorescences denoted the absence of Tie-2 expression by peripheral monocytes from this control subject, at least in this image field. By contrast, some Tie-2 expressing monocytes (TEMs), expressing Tie-2 at different levels, were observed in samples from CHC patients. The expression of Ang-1 seemed to be slightly diminished in peripheral monocytes from CHC whereas Ang-2 resulted increased (c). Original magnifications $\times 400$.

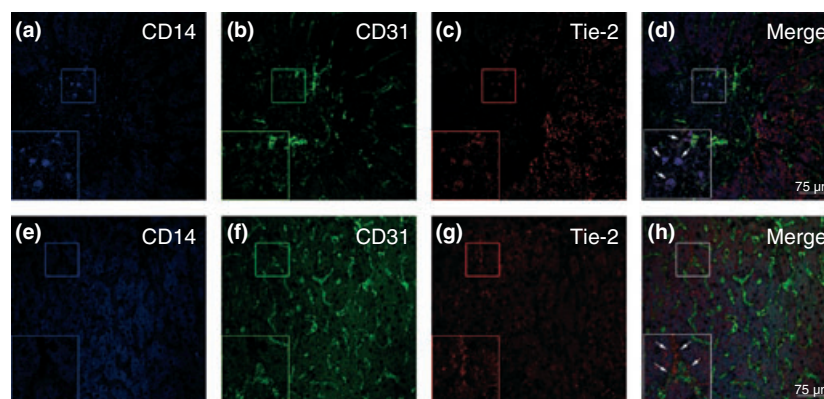


Figure 5 | Intrahepatic identification of TEMs in livers from chronic hepatitis C (CHC) patients. Immunofluorescence experiments were performed on cryostat sections from CHC liver biopsies. Image acquisition of single fluorescence identified in the same section CD14, CD31 and Tie-2 (a-c and e-g, respectively) of different representative CHC patients. Their combined immunofluorescences are also shown (d & h). Tie-2 expression was observed surrounding the hepatic infiltrates, in which Tie-2 expressing monocytes (TEMs) could be distinguished (a-d, arrows). Intrahepatic Tie-2 expressing cells were frequently associated with endothelial CD31 positive cells (e-h). Original magnifications: $\times 400$. Left bottom squares denote amplified sections ($2\times$).

monocytes, particularly with the CD14h/CD16h monocyte subpopulation ($P = 0.001$ both) as there was not found any association with the CD14l/CD16h subset (data not shown). Interestingly, the proinflammatory monocyte subsets CD16h were correlated inversely with viraemia levels ($P = 0.004$). (Supplementary Figure S2)

Angiogenesis and remodelling factors are differentially expressed by peripheral blood monocytes of CHC patients

With regard to the release of diverse angiogenesis factors by the isolated circulating monocytes assessed using ELISA (for Ang-1 and Ang-2) or immunofluorescence array (for the other factors), we observed an evident decline in Ang-1 levels in samples from CHC patients ($P = 0.018$), whereas other factors, such as angiogenin, B-FGF, leptin, PDGF-BB and PIGF, were significantly upregulated (Figure 4a).

Except for MMP-1 and MMP-3, the levels of all analysed tissue remodelling factors were not significantly decreased in the supernatants of monocytes from CHC patients, mainly MMP-9 and TIMPs (Figure 4b).

Opposite trends in the expression of Tie-2 and in the release of Ang-1 and Ang-2 by CHC and control monocytes could also be appreciated in the immunofluorescence experiments (Figure 4c).

TEMs were distinguished at portal liver infiltrates of CHC patients

Immunofluorescence staining of intrahepatic Tie-2 revealed the existence of TEMs at inflamed portal tracts of different CHC patients since many of these cells co-expressed CD14 (Figures 5a-d). CD31 staining was shown at hepatic sinusoids and was frequently associated with Tie-2 positive cells (Figures 5e-h). Interestingly, Tie-2 expression was found at hepatic parenchyma surrounding portal infiltrates (Figures 5a-d). The confocal analysis showed the simultaneous expression of Tie-2 in CD14 positive cells (Supplementary Figure S4).

DISCUSSION

Insults to tissues elicit a cascade of physiological events that are focused on eliminating them and effecting a return to the resting steady-state. Hence, many opposing molecular mechanisms can coexist, but they must be orchestrated perfectly in a space-temporal way. The frequent inability of the immune system to eradicate HCV infection entails the persistent damage of hepatic tissue, demanding the homing and differentiation of many cellular subsets that can mediate its healing. Monocytes comprise distinct subtypes of myeloid cells which display diverse phenotypes and functions depending on the physiopathological conditions, which range from immune antigen presentation to tissue remodelling.

Accordingly, separate proinflammatory (CD16+) and proangiogenic (Tie-2+) subsets of monocytes have been clearly distinguished.

Consistent with the constant immune requirements of chronically infected tissue, we have observed important increases in the proportion of peripheral monocytes, primarily of those that express high levels of CD16 and Tie-2, in the blood of CHC patients.

In this regard, the enhanced egress of monocytes from bone marrow in various pathological conditions, such as infections and other inflammatory situations, has been well documented.³⁰ In addition, the regulation of the number of peripheral monocytes by the differential expression of diverse chemokine receptors and their ligands, particularly on CD16-expressing monocytes, has been described.^{18, 31, 32} Accordingly, the percentage of CD16h monocytes in CHC patients correlated directly with the amount of peripheral monocytes but inversely with viral load. In this regard, the CD16+ subpopulation of peripheral monocytes seems to be of great importance for controlling HCV infection.

By contrast, the proportion of TEMs appeared to be inversely related to the achievement of response to antiviral therapy, being significantly higher in nonresponders compared with responders. In addition, naïve patients showed elevated percentage of TEMs compared with responders. The CD14h/Tie-2h monocyte population promotes tumour vascularisation and has been proposed to be precursors of tumour TEM populations.²⁴ Thus, TEMs might represent a novel useful prognostic factor of CHC response to treatment; hence, similar to what has been described for cancer,^{13, 33, 34} the characterisation of TEMs function might also identify a valuable molecular target for future therapies of chronic inflammatory diseases.

On further examination of peripheral monocyte phenotypes using multifuorescence assays, we found that CD16h and Tie-2h monocytes increased significantly in CHC patients independently of their respective expression of Tie-2 or CD16. Interestingly, we have observed that CD16+ monocytes, particularly those expressing low levels of Tie-2 (Tie-2l/CD16+), were reversely correlated with viraemia. CD16h monocytes are highly phagocytic and are the chief producers of proinflammatory cytokines and tumour necrosis factor- α (TNF- α) after lipopolysaccharide (LPS) stimulation.³⁵ Thus, this subpopulation of peripheral monocytes may help to establish an effective immune response promoting viral HCV clearance. By other way, has recently been reported the important contribution of CD16+ monocytes to the progression of human hepatic fibrosis at advanced

stages.³⁶ However, we could not observe such significant relation maybe due to the wide spectrum of fibrosis stages of our patients, ranging from F = 1 to F = 4.

It is important to note that Tie-2/CD16 double-positive monocytes were also significantly increased in CHC patients. This monocyte subset has been described as circulating tissue macrophage precursors that have robust phagocytic and angiogenic activities, contributing both to the clearance and repair of injured tissues.²⁰

On the other hand, the peripheral fraction of TEMs that express low levels of CD16 (Tie-2h/CD16l) is related to response failure. This subpopulation could increase after liver injury to support tissue healing, based on their remodelling properties,³⁷ but their immunosuppressive nature³⁸ might fade the effect of the therapy against CHC. The lack of response to treatment perpetuates liver damage and neoangiogenesis,³⁹ possibly towards intrahepatic synthesis of the Tie-2 ligand, Ang-2, as observed by our group in CHC⁴⁰ and other inflammatory liver diseases.^{41–43} As described, Tie-2 signalling also mediates bone marrow homing and chemotaxis of myeloid precursors, favouring the peripheral accumulation of TEMs and their recruitment by injured tissue or tumour-secreted Ang-2, where they can sustain deleterious effects by prolonging angiogenesis.^{33, 34, 41} These facts may highlight the importance of this subpopulation of monocytes in the balance between tissue regeneration or damage.

To determine the specific influence of CHC on the release of angiogenic and remodelling factors by peripheral monocytes, their spontaneous secretion was analysed after being cultured for 24 h without any additional stimulation. A patent decline in Ang-1 expression was accompanied by increased synthesis of angiogenin, B-FGF, HGF, leptin, PDGF-BB and PlGF by monocytes from CHC patients. Unfortunately, the minimal occurrence of above described monocyte subpopulations in the blood of CHC has hampered the study of their specific functions or the analysis of their respective expression of angiogenic and remodelling factors due to ethical considerations. Nonetheless, this profile of angiogenic factors might reflect the repercussions of adjustments in vessel quiescence, shifting to a more leaky and sprouting vasculature;^{44–46} this model is consistent with previous studies of serum in CHC patients who have noted their usefulness in monitoring CHC disease progression.^{47, 48} In addition, most of these factors are related to tissue remodelling and their induction is associated with hepatocellular carcinoma onset and progression.^{47, 49}

Finally, the intrahepatic inspection of TEMs using immunofluorescence revealed their preferential location

at inflamed hepatic portal tracts, being some of them closely related to endothelial vasculature. This might reflect their described characteristics as paracrine mediators of angiogenesis rather than being actively incorporated into the neovasculature.²⁷ In addition, the intrahepatic expression of Tie-2, closely related to CD31 positive cells, could reveal areas of active fibrogenesis as previously referred,^{50, 51} in which Tie-2 is expressed by activated α -SMA positive cells at the leading edge of developing fibrotic septa, in contrast to the restricted endothelial expression of Tie-2 along large bridging septa of cirrhotic patients.^{52, 53}

Collectively, these data indicate that certain monocyte subsets are primed in CHC based on their particular functions.³⁸ The herein characterisation of peripheral monocyte subgroups in the blood of patients with CHC reflected a significant polarisation of these subpopulations to those with highest pro-inflammatory and pro-angiogenic potential, which was linked to significant differences in the expression of several angiogenic factors (Supplementary Figure S3). Moreover, we have identified that the induction of TEMs, mainly those that express low levels of CD16 (CD16^l/Tie-2^h), was associated with CHC treatment outcome, whereas the induction of the opposite monocyte subtype CD16^h/Tie-2^l was related to viraemia (data not shown).

Consequently, it would be very worthy to analyse the repercussion of the balance among the different peripheral monocyte subsets in the onset and progression of chronic hepatitis C, as well as other infectious and inflammatory diseases, with special attention to their close relationship with tumour development.^{54, 55}

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors acknowledge the technical assistance provided by Francisca Molina Jiménez, Mónica Gordón Alonso and Hortensia de la Fuente, Molecular Biology and Immunology Unit, Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, Spain. *Declaration of personal interests:* None. *Declaration of funding interests:* This study was funded by Fundación Médica Mutua-Madrileña, grant numbers 2008 and 2010 to P. S-C and R. M-O, respectively; MICINN, grant numbers SAF 2007/63674 and SAF 2010/21805 to R. M-O; CIBERehd (Instituto de Salud Carlos III) to R. M-O. Y. Rodríguez-Muñoz was supported by a predoctoral fellow of Instituto de Salud Carlos III, grant number FI06/00269.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Characterisation of Tie-2 and CD16-positive monocyte subsets within CD14/CD16 and CD14/Tie-2 subgroups. Box plots (A and B) show the median percentages $\pm 95\%$ CI of different characterised monocyte subsets in the blood of controls or CHC patients. As shown, relevant increases of Tie-2⁺ and CD16⁺ peripheral monocytes could be observed in CHC patients compared to controls, mainly of those CD14^h which simultaneously express low levels of the other analysed marker, CD16 or Tie-2 (first dark grey box of A and B graphs, respectively). Statistical significance by Mann-Whitney *U*-test is shown as * for $P < 0.05$ and *** for $P < 0.001$.

Figure S2. The proportion of peripheral proinflammatory monocyte subsets correlates with the percentage of monocytes and viral load in patients with CHC. Spearman's rank correlation graphs between percentage of peripheral CD16^h monocytes and the total peripheral monocyte proportions in CHC patients are shown (A). The correlation between viraemia and the percentage of CD16⁺ monocyte subset characterised in CHC patients' blood show that circulating proinflammatory monocytes are significantly higher in CHC patients with low viral load (B). Statistical significance (*P*) and Spearman's rho (*r*) are shown.

Figure S3. Schematic illustration of main representative monocytes subsets phenotyped in the peripheral blood of controls, total CHC patients, responders and nonresponders. Monocyte: without expression of Tie-2 or CD16; Tie-2: monocyte subgroup expressing this receptor above 10 MIF; CD16: subpopulation of peripheral monocytes which expresses this receptor above 10 MIF; Tie-2^h/CD16^l: subset of monocytes which level of Tie-2 is above 10 MIF whereas the level of CD16 is below 10 MIF. A1: Angiopoietin 1; Angio: Angiogenin.

Figure S4. Confocal analysis of TEMs. The histograms illustrate the MIF of CD14 and Tie-2 stainings along the axis of a representative Tie-2 expressing monocyte (A). Box plots show the medians $\pm 95\%$ CIs of maximum fluorescence intensity (C) and integrated fluorescence density of the identified TEMs (ImageJ software, version 1.43) from three different analysed CHC patients (D). Blue line/box: antiCD14-APC; red line/box: antiTie-2-AlexaFluor 568.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

REFERENCES

- Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 2006; **1**: 23–61.
- Zoulum F, Chevallier M, Maynard M, Trepo C. Clinical consequences of hepatitis C virus infection. *Rev Med Virol* 2003; **13**: 57–68.
- Bode JG, Brenndorfer ED, Haussinger D. Hepatitis C virus (HCV) employs multiple strategies to subvert the host innate antiviral response. *Biol Chem* 2008; **389**: 1283–98.
- Irshad M, Khushboo I, Singh S. Hepatitis C virus (HCV): a review of immunological aspects. *Int Rev Immunol* 2008; **27**: 497–517.
- Shetty S, Lalor PF, Adams DH. Lymphocyte recruitment to the liver: molecular insights into the pathogenesis of liver injury and hepatitis. *Toxicology* 2008; **254**: 136–46.
- Chaparro M, Sanz-Cameno P, Trapero-Marugan M, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R. Mechanisms of angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Ann Hepatol* 2007; **6**: 208–13.
- Garcia-Monzon C, Sanchez-Madrid F, Garcia-Buey L, Garcia-Arroyo A, Garcia-Sanchez A, Moreno-Otero R. Vascular adhesion molecule expression in viral chronic hepatitis: evidence of neoangiogenesis in portal tracts. *Gastroenterology* 1995; **108**: 231–41.
- Medina J, Arroyo AG, Sanchez-Madrid F, Moreno-Otero R. Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Hepatology* 2004; **39**: 1185–95.
- Noonan DM, De Lerma Barbaro A, Vannini N, Mortara L, Albini A. Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. *Cancer Metastasis Rev* 2008; **27**: 31–40.
- Anghelina M, Krishnan P, Moldovan L, Moldovan NI. Monocytes and macrophages form branched cell columns in matrigel: implications for a role in neovascularization. *Stem Cells Dev* 2004; **13**: 665–76.
- Anghelina M, Krishnan P, Moldovan L, Moldovan NI. Monocytes/macrophages cooperate with progenitor cells during neovascularization and tissue repair: conversion of cell columns into fibrovascular bundles. *Am J Pathol* 2006; **168**: 529–41.
- Gordon S. Do macrophage innate immune receptors enhance atherogenesis? *Dev Cell* 2003; **5**: 666–8.
- McLean K, Buckanovich RJ. Myeloid cells functioning in tumor vascularization as a novel therapeutic target. *Transl Res* 2008; **151**: 59–67.
- Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**: 669–92.
- Glod J, Kobiler D, Noel M, *et al.* Monocytes form a vascular barrier and participate in vessel repair after brain injury. *Blood* 2006; **107**: 940–6.
- Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 2006; **211**: 609–18.
- Ziegler-Heitbrock HW. Definition of human blood monocytes. *J Leukoc Biol* 2000; **67**: 603–6.
- Mizuno K, Toma T, Tsukiji H, *et al.* Selective expansion of CD16^{high}CCR2⁺ subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. *Clin Exp Immunol* 2005; **142**: 461–70.
- Ziegler-Heitbrock L. The CD14 + CD16 + blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 2007; **81**: 584–92.
- Urta X, Villamor N, Amaro S, *et al.* Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; **29**: 994–1002.
- De Palma M, Venneri MA, Galli R, *et al.* Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 2005; **8**: 211–26.
- Lyden D, Hattori K, Dias S, *et al.* Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001; **7**: 1194–201.
- Nasrre P, Thomas M, Kruse K, *et al.* Host-derived angiopoietin-2 affects early stages of tumor development and vessel maturation but is dispensable for later stages of tumor growth. *Cancer Res* 2009; **69**: 1324–33.
- Venneri MA, De Palma M, Ponzoni M, *et al.* Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood* 2007; **109**: 5276–85.
- De Palma M, Murdoch C, Venneri MA, Naldini L, Lewis CE. Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications. *Trends Immunol* 2007; **28**: 519–24.
- De Palma M, Naldini L. Tie2-expressing monocytes (TEMs): novel targets and vehicles of anticancer therapy? *Biochim Biophys Acta* 2009; **1796**: 5–10.
- Ribatti D. The paracrine role of Tie-2-expressing monocytes in tumor angiogenesis. *Stem Cells Dev* 2009; **18**: 703–6.
- Makinde T, Agrawal DK. Intra and extravascular transmembrane signalling of angiopoietin-1-Tie2 receptor in health and disease. *J Cell Mol Med* 2008; **12**: 810–28.
- Fiedler U, Augustin HG. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol* 2006; **27**: 552–8.
- Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW. The novel subset of CD14 + /CD16 + blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 1993; **82**: 3170–6.
- Ancuta P, Rao R, Moses A, *et al.* Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16 + monocytes. *J Exp Med* 2003; **197**: 1701–7.
- Grip O, Bredberg A, Lindgren S, Henriksson G. Increased subpopulations of CD16(+) and CD56(+) blood monocytes in patients with active Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; **13**: 566–72.
- Lewis CE, Hughes R. Inflammation and breast cancer. Microenvironmental factors regulating macrophage function in breast tumours: hypoxia and angiopoietin-2. *Breast Cancer Res* 2007; **9**: 209.
- Pulaski HL, Spahlinger G, Silva IA, *et al.* Identifying alemtuzumab as an anti-myeloid cell antiangiogenic therapy for the treatment of ovarian cancer. *J Transl Med* 2009; **7**: 49.
- Skrzeczynska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14^{high} CD16 + monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* 2008; **67**: 152–9.
- Zimmermann HW, Seidler S, Nattermann J, *et al.* Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PLoS ONE* 2010; **5**: e11049.
- Nowak G, Karrar A, Holmen C, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 or Tie-2 on peripheral blood cells defines functionally competent cell populations capable of reendothelialization. *Circulation* 2004; **110**: 3699–707.
- Pucci F, Venneri MA, Biziato D, *et al.* A distinguishing gene signature shared by tumor-infiltrating Tie2-expressing monocytes, blood “resident” monocytes, and

- embryonic macrophages suggests common functions and developmental relationships. *Blood* 2009; **114**: 901–14.
39. Gabriel A, Kukla M, Wilk M, Liszka L, Petelenz M, Musialik J. Angiogenesis in chronic hepatitis C is associated with inflammatory activity grade and fibrosis stage. *Pathol Res Pract* 2009; **205**: 758–64.
40. Sanz-Cameno P, Martin-Vilchez S, Rodríguez-Munoz Y, *et al.* Intrahepatic angiopoietin-2 protein expression modulation by hepatitis C virus: MAPK, PI3K and reactive oxygen species (ROS) implication. *J Hepatol* 2008; **48**: S230–1.
41. Murdoch C, Tazzyman S, Webster S, Lewis CE. Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2. *J Immunol* 2007; **178**: 7405–11.
42. Sanz-Cameno P, Martin-Vilchez S, Lara-Pezzi E, *et al.* Hepatitis B virus promotes angiopoietin-2 expression in liver tissue: role of HBV x protein. *Am J Pathol* 2006; **169**: 1215–22.
43. Figueroa-Vega N, Sanz-Cameno P, Moreno-Otero R, Sanchez-Madrid F, Gonzalez-Amaro R, Marazuela M. Serum levels of angiogenic molecules in autoimmune thyroid diseases and their correlation with laboratory and clinical features. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; **94**: 1145–53.
44. Scharpfenecker M, Fiedler U, Reiss Y, Augustin HG. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *J Cell Sci* 2005; **118**(Pt 4): 771–80.
45. Fukuhara S, Sako K, Noda K, Nagao K, Miura K, Mochizuki N. Tie2 is tied at the cell-cell contacts and to extracellular matrix by angiopoietin-1. *Exp Mol Med* 2009; **41**: 133–9.
46. Thomas M, Augustin HG. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* 2009; **12**: 125–37.
47. Mas VR, Maluf DG, Archer KJ, Yanek KC, Fisher RA. Angiogenesis soluble factors as hepatocellular carcinoma noninvasive markers for monitoring hepatitis C virus cirrhotic patients awaiting liver transplantation. *Transplantation* 2007; **84**: 1262–71.
48. Salcedo Mora X, Sanz-Cameno P, Medina J, *et al.* Association between angiogenesis soluble factors and disease progression markers in chronic hepatitis C patients. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; **97**: 699–706.
49. Mann CD, Neal CP, Garcea G, Manson MM, Dennison AR, Berry DP. Prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Eur J Cancer* 2007; **43**: 979–92.
50. Torimura T, Ueno T, Kin M, *et al.* Overexpression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004; **40**: 799–807.
51. Martin-Vilchez S, Rodríguez-Munoz Y, Lopez-Rodriguez R, *et al.* Hepatitis C virus promotes human hepatic stellate cells migration. *J Hepatol* 2009; **50**: S949–50.
52. Medina J, Sanz-Cameno P, Garcia-Buey L, Martin-Vilchez S, Lopez-Cabrera M, Moreno-Otero R. Evidence of angiogenesis in primary biliary cirrhosis: an immunohistochemical descriptive study. *J Hepatol* 2005; **42**: 124–31.
53. Novo E, Cannito S, Zamara E, *et al.* Proangiogenic cytokines as hypoxia-dependent factors stimulating migration of human hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 2007; **170**: 1942–53.
54. Huang H, Bhat A, Woodnutt G, Lappe R. Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. *Nat Rev Cancer* 2010; **10**: 575–85.
55. Sanz-Cameno P, Trapero-Marugan M, Chaparro M, Jones EA, Moreno-Otero R. Angiogenesis: from chronic liver inflammation to hepatocellular carcinoma. *J Oncol* 2010; **2010**: 272170.